

**UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG
UND FRAKTIONIERUNG VON PRIMÄRKULTUREN
DES ZENTRALNERVENSYSTEMS**

Dietrich van Calker

1977

Untersuchungen zur Charakterisierung
und Fraktionierung von Primärkulturen
des Zentralnervensystems

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Dietrich van Calker
aus Münster/Westf.

München 1977

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 1977



Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1974 bis März 1977 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Dr. B. Hamprecht am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt (Leitung Prof. Dr. F. Lynen).

Herrn Dr. Hamprecht danke ich für sein stetes Interesse an dieser Arbeit, für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Fräulein Margarete Müller möchte ich für ihre zuverlässige und engagierte Mitarbeit seit Mai 1976 herzlich danken.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. J. Spieß und Herrn H. Engeser für ihre Hilfe bei der Durchführung der Aminosäureanalysen, den Firmen Smith, Kline und French, Dolder und Hoffmann - La Roche für die Überlassung von Drogen sowie der Max-Planck-Gesellschaft für materielle und finanzielle Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung.....	1
1.1	Modellsysteme zum Studium multizellulärer differen- zierter Systeme.....	1
1.2	Aufgabenstellung.....	14
2.	Ergebnisse und Diskussion.....	
2.1	Bestimmung cyclischer Nukleotide.....	
2.1.1	cAMP-Bestimmung.....	17
2.1.2	cGMP-Bestimmung.....	17
2.1.2.1	Meßbereich der cGMP-Bestimmung.....	17
2.1.2.2	Zuverlässigkeit und Richtigkeit in Serienbestimmungen	20
2.1.2.3	Bindekapazität des cGMP-Bindungsproteins: Einfluß von Einfrieren bzw. Auftauen.....	21
2.1.2.4	Störung des Tests durch Nukleosid-Derivate.....	22
2.1.2.5	Bestimmung von cGMP in Zellextrakten: Proportionali- tät und Wiederfindung.....	23
2.2	Primärkulturen des Gehirns.	25
2.2.1	Morphologie: Entwicklung der Kulturen.....	27
2.2.2	Wirkung von Neurohormonen auf Primärkulturen.....	31
2.2.2.1	Adrenerge Agonisten.....	31
2.2.2.2	Adenosin und seine Derivate.....	45
2.2.2.3	Histamin.....	60
2.2.2.4	Prostaglandine.....	70
2.2.2.5	Serotonin, Carbamylcholin, Melatonin.....	72
2.2.2.6	Hormonkombinationen.....	73
2.2.3	Reproduzierbarkeit der gemessenen Effekte.	77
2.2.4	Die Zuordnung eines Satzes von differenzierten Eigen- schaften: Eine Möglichkeit zur Identitätsmarkierung von Zellen in gemischten Kulturen begrenzter Heterogeni- tät?.....	80
2.3	Wirkung von Neurohormonen auf Ratten-Gliomazellen C6.	85
2.3.1	Adrenerge Agonisten.....	85
2.3.2	Histamin und Adenosin.....	88
2.3.3.	Carbamylcholin.....	90

2.3.4	Untersuchungen zur Wirkung weiterer pharmakologisch aktiver Substanzen.....	93
2.4	Diskussion der Effekte von Neurohormonen auf die intrazellulären Spiegel der cyclischen Nukleotide in Primärkulturen und Gliomazellen.....	98
2.4.1	Effekte auf den cAMP-Spiegel der Zellen.....	98
2.4.2	Effekte auf den cGMP-Spiegel der Zellen.....	101
2.5	Vorbereitende Arbeiten zum Studium von Primärkulturen neuronaler Zellen.....	102
2.6	Untersuchungen zur Entwicklung einer Methode der rezeptor-spezifischen Anreicherung von Zellen.....	105
2.6.1	Die Verwendung spezifischer Antikörper zur Anreicherung von Zellen.....	107
2.6.2	Der Einfluß von Normalseren auf den intrazellulären Gehalt an cyclischen Nukleotiden in Zellkulturen...	108
2.6.2.1	Zeitabhängigkeit des Serum-Effektes.....	111
2.6.2.2	Der inhibitorische Effekt des Serums ist nicht kompetitiv.....	114
2.6.2.3	Der wirksame Faktor im Normalserum ist hitzestabil und säure- und alkaliresistent.....	116
2.6.2.4	Der wirksame Faktor adsorbiert an Holzkohle; Vergleich der Hemmeffekte verschiedener foetaler Kalbsseren; Entfernung von Lipiden oder Lipoproteinen hat keinen Einfluß auf die inhibitorische Aktivität.....	119
2.6.2.5	Einfluß verschiedener Enzyme auf die inhibitorische Aktivität im Serum.....	125
2.6.2.6	Diskussion der Ergebnisse.....	125
2.6.3	Versuche zur Gewinnung von Antiseren gegen Hormonrezeptoren.....	126
2.6.4	Untersuchungen zur Realisierung einer "Hapten-Sandwich"-Technik zur spezifischen Bindung von Antikörpern an Hormonrezeptoren.....	128
3.	Experimenteller Teil.....	133
3.1	Apparate, Geräte, Hilfsmittel.....	133
3.1.1	Zellkultur.....	133
3.1.2	Bestimmung cyclischer Nukleotide.....	133

	<u>Seite</u>
3.1.3	Sonstiges..... 133
3.2	Chemikalien..... 134
3.2.1	Allgemeine Chemikalien..... 134
3.2.2	Antikörper..... 135
3.2.3	Enzyme..... 135
3.2.4	Radiochemikalien..... 136
3.3	Zellkultur..... 136
3.3.1	Verwendete Zell-Linien..... 136
3.3.2	Allgemeine Zellkulturmethodik..... 136
3.3.2.1	Verwendete Lösungen..... 136
3.3.2.2	Subkultivieren von Zellen..... 138
3.3.3	Primärkulturen..... 138
3.3.3.1	Hirnkulturen..... 139
3.3.3.2	Skelettmuskel-Kulturen..... 140
3.3.3.3	Herzmuskel-Kulturen..... 142
3.4	Bestimmung cyclischer Nukleotide..... 143
3.4.1	Isolierung von cAMP-Bindungsprotein..... 143
3.4.2	Isolierung von cGMP-Bindungsprotein..... 143
3.4.3	Inkubation von Zellen mit Hormonen, Extraktion der cyclischen Nukleotide..... 144
3.4.4	Anionenaustauscherchromatographie, Trennung von cAMP und cGMP..... 145
3.4.5	Proteinbindungstest für cAMP..... 147
3.4.6	Proteinbindungstest für cGMP..... 147
3.5	Radioimmunologische Bestimmung von Enkephalin..... 149
3.5.1	Synthese von jodiertem Leu-Enkephalin..... 149
3.5.2	Katalytischer Jod-Tritium Austausch und radiochemische Reinheit des Produktes..... 152
3.5.3	Herstellung von enkephalin-spezifischen Antikörpern..... 152
3.5.3.1	Kopplung von Enkephalin an BSA und Polylysin..... 152
3.5.3.1.1	Carbodiimid-Kopplung..... 152
3.5.3.1.2	Glutaraldehyd-Kopplung..... 153
3.5.3.2	Immunisierung von Kaninchen..... 153
3.5.3.3	Gewinnung und Test der Antisera..... 154
3.5.4	Erstellung einer Eichkurve zur Bestimmung von Enkephalin und Probenaufbereitung..... 156

3.6	Kopplung von Noradrenalin an Serumalbumin und Versuche zur Zellkopplung.....	157
3.7	Behandlung von Normalseren zur Charakter- isierung des die cAMP-Akkumulation hemmen- den Serumfaktors.....	158
3.7.1	Hitzebehandlung.....	158
3.7.2	Säure- und Alkalibehandlung.....	158
3.7.3	Herstellung von lipidfreiem Serum.....	159
3.7.4	Abtrennung von β -Lipoproteinen.....	159
3.7.5	Enzymbehandlung.....	160
3.8	Gewinnung und Test von Antikörpern gegen Gli- omazellen und Neuroblastoma x Glioma-Hybrid- zellen.....	160
3.8.1	Herstellung der Antiseren.....	160
3.8.2	Test der Antiseren durch indirekte Immun- fluoreszenz.....	163
3.8.3	Test der Antiseren auf hemmende Wirkung auf die Steigerung der intrazellulären cAMP- Spiegel.....	164
3.9	Gewinnung von Anti-Phenoxybenzamin-Antikör- pern.....	164
3.9.1	Herstellung von Phenoxybenzamin-Albumin-Kon- jugaten.....	165
3.9.1.1	Kopplung von Phenoxybenzamin an Glutathion; Charakterisierung des Reaktionsproduktes durch Aminosäureanalyse und Dünnschichtchromato- graphie.....	165
3.9.1.2	Einführung von zusätzlichen SH-Gruppen in Serumalbumin.....	166
3.9.1.3	Kopplung von Phenoxybenzamin an Serumalbumin oder Polylysin.....	167
3.9.1.4	Gewinnung und Test der Anti-Phenoxybenzamin- Antiseren.....	168
3.9.1.5	Anreicherung der Anti-Phenoxybenzamin-Anti- körper.....	169
3.9.1.6	Test der Anti-Phenoxybenzamin-Antikörper auf Bindung an zellgebundenes Phenoxybenzamin durch indirekte Immunfluoreszenz.....	169

3.10	Proteinbestimmung.....	170
4.	Zusammenfassung.....	171
5.	Literaturverzeichnis.....	173
	Lebenslauf.....	193

Abkürzungen

ACEI	Angiotensin converting enzyme inhibitor
AcCH	Acetylcholin
AcChE	Acetylcholinesterase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BBS	0.15 M NaCl, 20 mM Borat pH 8.0 (borate buffered salt solution)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cAMP	Adenosin-3':5'-monophosphat, cyclisch
CAT	Cholinacetyltransferase
CDI	Carbodiimid, hier immer: 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)carbodiimid metho - p-toluolsulfonat
cGMP	Guanosin-3':5'-Monophosphat, cyclisch
Ci	Curie
COMT	Katecholamin-O-Methyltransferase
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro min (counts per min)
D1 Gluc/ Suc	Puck's Medium D1 mit Glucose und Sucrose (175)
D2	Puck's Medium D2 (175)
DBCA	N ⁶ , O ^{2'} -Dibutyryl - cAMP
DEAE- desoxy-G- 3':5'-MP	Diäthylaminoäthyl- Desoxy- Guanosin-3':5'-monophosphat, cyclisch
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
FCS	foetales Kälberserum (fetal calf serum)
GABA	γ - Aminobuttersäure

GAD	Glutamat-Decarboxylase
GFA-	glial fibrillary acidic -
G-2':3'-	
MP	Guanosin-2':3'-monophosphat, cyclisch
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HS	Pferdeserum (horse serum)
i.c.	intracutan
IC50	Konzentration, bei der 50% Hemmung erreicht wird
i.m.	intramuskulär
Iprot	Isopropylarterenol (Isoproterenol)
KPP	Kaliumphosphatpuffer
MAO	Monoaminoxidase
MIBX	1-Methyl-3-Isobutylxanthin
min	Minute(n)
NA	Noradrenalin
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
PBS	0.15 M NaCl, 10 mM Kaliumphosphat pH 7.4 (phosphate buffered salt solution)
PGE	Prostaglandin E
RIA	Radioimmunoassay
RNS	Ribonucleinsäure
RSA	Kaninchenserumalbumin (rabbit serum albumin)
S.A.	Standardabweichung(en)
SAMSA	S-Acetylmercaptobornsteinsäureanhydrid
s.c.	subcutan
sek	Sekunde(n)
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u...	mikro...(µ)
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Modellsysteme zum Studium multizellulärer differenzierter Systeme

Die Evolution zu hochentwickelten vielzelligen Organismen führte zu zwei charakteristischen Merkmalen:

- 1) Die arbeitsteilige Organisation des Zellverbandes;
- 2) die Notwendigkeit der Kommunikation zwischen den verschieden differenzierten Zellen und Zellverbänden.

Für den Terminus "Differenzierung" gaben Jacob und Monod folgende, weitgefaßte Definition: "two cells are differentiated with respect to one another if, while they harbour the same genome, the pattern of proteins which they synthesize is different" (1). Differenzierung läßt sich, enger gefaßt, beschreiben als die Eigenart mancher Zellen, Funktionen zu erfüllen, die nicht für das Überleben der entsprechenden Einzelzelle, wohl aber für das Überleben des gesamten Zellverbandes notwendig sind. Solche Funktionen bezeichnet man auch als "Luxusfunktionen". Die arbeitsteilige Organisation des Zellverbandes erfordert, daß die Luxusfunktionen verschiedener Zellen aufeinander abgestimmt werden. Damit der erforderliche Informationsaustausch zwischen den Zellen möglich wird, müssen vorhanden sein:

- 1) Ein Kode, zur Umsetzung der Nachricht in ein übermittelbares Signal,
- 2) kognitive Elemente auf den Zellen zum Empfang der Signale,
- 3) ein System der Dekodierung.

Eine Analyse der biochemischen Funktion hochentwickelter Organismen hat daher folgende Fragen zu lösen:

- 1) Welche Luxusfunktionen werden von welchen Zelltypen ausgeübt und worin liegt deren Bedeutung für das Überleben des Organismus?
- 2) Welches ist der Kode, in dem sich die Zellen einander mitteilen?
- 3) Welche kognitiven Elemente besitzt die Zelle?
- 4) Welches System der Dekodierung wird benutzt?
- 5) Welche biochemischen Eigenschaften der Zelle ändern sich nach Empfang der Information?
- 6) Wie findet die Rückmeldung ("feedback") statt?

Zellen kommunizieren miteinander auf chemischem Wege mittels hormonartiger Substanzen. Die zu übermittelnde Information wird in "willkürlichen" Einheiten kodiert: Nur diejenige Zelle, die über die entsprechenden Hormonrezeptoren verfügt, ist in der Lage, die Botschaft zu entschlüsseln (2).

Die Untersuchung der angeführten Probleme wird vor allem dann schwierig, wenn das zu erforschende Teilsystem (Organ, funktionelle Einheit) selbst wieder aus einer Anzahl unterschiedlich differenzierter Zelltypen verschiedener Luxusfunktionen besteht, deren Zusammenwirken für die Funktion ausschlaggebend ist. Dies ist zum Beispiel beim Immunsystem und beim Nervensystem der Fall. Solange ein solches System in intaktem Zustand untersucht wird, kann nur das Resultat des Zusammenwirkens verschiedener Luxusfunktionen gemessen werden (z.B. humorale und zelluläre Immunreaktion bzw. Reizleitung, elektrische und chemische Erregbarkeit, Synapsenbildung). Zur differentiellen Analyse der einzelnen Teilfunktionen sind prinzipiell zwei Wege denkbar:

- 1) Die selektive Inhibition ("Vergiftung") aller beteiligter Zelltypen mit Ausnahme des zu untersuchenden;
- 2) die Auftrennung des Zellgemisches in reine Subpopulationen eines Typs.

Der zweite Weg wurde zur Analyse immunkompetenter Zellen bereits erfolgreich beschritten (Übersichtsartikel: 3).

Die Gewinnung reiner Subpopulationen von Zellen des Nervensystems stößt dagegen auf erhebliche Schwierigkeiten. Die verschiedenen Zelltypen (Epithelzellen, Ependymzellen, Glia- und Neuron-Subklassen) sind - im Gegensatz zur Situation im retikuloendothelialen System - im Zentralnervensystem so eng untereinander vernetzt, daß schon die Gewinnung einer gemischten Einzelzellsuspension von lebensfähigen, voll differenzierten Zellen bislang ein unüberwindliches Problem darstellte. Versuche in dieser Richtung führten zwar zur Isolierung und Trennung der kaum lebensfähigen Zellrümpfe von Neuronen und Gliazellen (4-14), an denen Luxusfunktionen des Nervensystems gemessen werden konnten (14). Für eine verlässliche Analyse des biochemischen Mechanismus zellulärer Wechselwirkung sind aber lebensfähige Zellen mit intakter Zellmembran eine notwendige Voraussetzung. Ob die kürzlich publizierte Gewinnung "strukturell integrier" Zellkörpern aus dem Kleinhirn junger Ratten (15) hier einen Fortschritt darstellt, bleibt abzuwarten.

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten bei der Gewinnung von funktionell intakten Einzelzellen des Nervensystems konnten einige typische Luxusfunktionen bereits bestimmten Zellklassen zugeordnet werden. Diese Erkenntnisse seien kurz skizziert: Nervenzellen ("Neuronen") machen etwa 50% der Hirnmasse und etwa 10% der Zellzahl des Gehirns aus. Typische differenzierte Eigenschaften dieser Zellen sind:

- 1) Elektrische und chemische Erregbarkeit,
- 2) Fähigkeit zur Synapsenbildung,
- 3) Synthese von Neurotransmittern.

Die Funktionen der Gliazellen, die die restlichen 50% der Hirnmasse, aber 90% der Zellzahl des Gehirns ausmachen, sind noch weitgehend unverstanden. Man unterscheidet zwischen Oligodendrocyten und Astrocyten. Oligodendrocyten scheinen für die elektrische Isolation der Nervenzellen zuständig zu sein. Der enge Kontakt der Astrocyten mit den Blutkapillaren des Gehirns einerseits und den Neuronen andererseits könnte auf eine Bedeutung dieser Zellen im Stoffaustausch zwischen vaskulärem System und Nervenzellen hinweisen (16, 17). Auch eine Bedeutung von Gliazellen für die rasche Entfernung der bei elektrischer Aktivität der Nervenzellen freigesetzten Kaliumionen (18) sowie von Neurotransmittern aus dem Extrazellulärraum (19) wurde postuliert.

Die biochemischen Untersuchungen waren bislang von dem Mangel an einem genügend definierten Untersuchungsobjekt gekennzeichnet, da aus den diskutierten Gründen eine Gewinnung von funktionell intakten differenzierten Hirnzellen nicht gelang. Wenn man an der stofflichen Zusammensetzung von Hirnteilen oder den biochemischen Charakteristika hirnspezifischer Substanzen (z.B. Neurotransmitter synthetisierenden Enzymen, Kompartimentierung in subzellulären Partikeln, speziellen Lipiden) interessiert ist, dann sind Schnitte oder Homogenate von Hirnteilen angemessene Untersuchungsobjekte. Aus Untersuchungen an Hirnschnitten oder Homogenaten lassen sich jedoch keine Aussagen über den individuellen Beitrag eines Zelltyps zur Funktion des Zellverbandes herleiten.

Einen Ausweg bot die Verwendung von Modellsystemen. Permanente Zell-Linien, die durch Klonierung (Vermehrung der Nachkommen einer Einzelzelle) aus Tumoren verschiedener Gewebe gewonnen wurden, können noch Luxusfunktionen besitzen, die für die untransformierten differenzierten Zellen des Ausgangsgewebes typisch sind (20-22).

Die Verwendung derartiger Zell-Linien zur Untersuchung der entsprechenden differenzierten Funktion hat einige entscheidende Vorteile:

- 1) Das Untersuchungsobjekt ist gut charakterisierbar und homogen;
- 2) da die Zellen in Kultur oder als Transplantationstumoren beliebig vermehrt werden können (permanente Zell-Linien), steht genügend Material für biochemische Untersuchungen zur Verfügung;
- 3) die Zellen sind in Kultur gut manipulierbar, Probleme, wie etwa die "Blut-Hirn-Schranke", entfallen;
- 4) ähnlich wie in der Bakteriologie lassen sich Versuchsserien leicht in Replika-Kulturen durchführen;
- 5) in speziellen Fällen können die Zellen in chemisch definierten Medien gezüchtet werden (Übersichtsartikel: 23). Damit sind Stoffwechselprodukte eindeutig charakterisierbar.

Zum Studium neuronaler Luxusfunktionen konnten Neuroblastoma- und vor allem Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen erfolgreich verwendet werden (Übersichtsartikel: 24-26). Neuronen-ähnliche, differenzierte Eigenschaften dieser Zellen sind z.B.:

- 1) Fähigkeit zur morphologischen Differenzierung (Bildung von Zellfortsätzen);
- 2) Gehalt an Neurotransmitter synthetisierenden Enzymen;
- 3) Gehalt an Vesikeln (Speicherung von Neurotransmittern ?);
- 4) Auslösung von Aktionspotentialen nach elektrischer oder chemischer Reizung;
- 5) Ausprägung von Rezeptoren, deren Stimulierung die Adenylatcyclase-Aktivität beeinflusst;
- 6) Synapsenbildung (bisher nur bei den Hybridzellen nachgewiesen).

Auch permanente Zell-Linien aus Glioma-Tumoren zeigen noch differenzierte Eigenschaften in Kultur. Menschliche Astrocytomazellen (27) akkumulieren cAMP nach Stimulierung mit PGE₁, Katecholaminen, Adenosin und Histamin (28-30), während Ratten-Gliomazellen C6 (31) nur auf die ersten beiden Drogen ansprechen (32-34). Die Ratten-Gliomazellen enthalten das ZNS-spezifische S-100-Protein (31). Sie können morphologisch differenziert werden (35) und antworten auf Reizung durch AcCh mit Hyperpolarisation (36). Ihre Plasmamembranen sind elektrisch nicht erregbar (36, 37). Sie zeigen die nervensystemspezifische (38) Induzierbarkeit der cytoplasmatischen Glycerinphosphat-Dehydrogenase durch Hydrocortison (39) und enthalten das astrocyten-spezifische (40)"glial fibrillary acidic" Protein (41, 42). Die Zellen besitzen aktive Aufnahmesysteme für die mutmaßlichen Aminosäure-Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure und Taurin und können letzteres auch synthetisieren (19). Auch eine klonale Zell-Linie des peripheren Nervensystems wurde beschrieben, deren differenzierte Funktionen zu ihrer Klassifizierung als Schwannzell-Linie führten (43).

Permanente Zell-Linien stellen daher wertvolle Modellsysteme für die Untersuchung von Luxusfunktionen des Nervensystems dar. Allerdings ist, wie bei allen Modellsystemen, die Aussagekraft der an diesen Modellen gewonnenen Erkenntnisse begrenzt: Die Kombination von Luxusfunktionen einer transformierten Zelle könnte infolge der Transformation und/oder häufiger Subkultivierung wesentlich gegenüber jener der entsprechenden untransformierten Zelle in vivo verändert sein. Wie erwähnt, kann aber gerade der spezifische Satz von Luxusfunktionen einer Zelle für ihre Funktion im intakten Zellverband bestimmend sein. Es müssen daher Methoden gefunden werden, die es erlauben, Zellen so in vitro zu kultivieren, daß sie den Satz von Luxusfunktionen aufweisen, der für ihre Funktion in situ verantwortlich ist.

Ein Modell, das die Untersuchung intakter und untransformierter Zellen unter Ausschaltung der Einflüsse des Gesamtorganismus gestattet, ist das Primärkultursystem. Zur Kultivierung von Gewebe des Nervensystems wurden im wesentlichen drei Wege beschritten (Übersichtsartikel: 44-48):

- 1) Organkulturen;
- 2) Explantatkulturen, in denen ein Teil der ursprünglichen zellulären Organisation des Gewebes erhalten bleibt;
- 3) Dissoziation des Gewebes in Einzelzellen durch enzymatische oder mechanische Methoden und a) Kultivierung der Zellen in zweidimensionalen Oberflächenkulturen oder b) Reaggregation der Einzelzellen und Kultivierung der Aggregate.

Als Ausgangsmaterial wird mit wenigen Ausnahmen (49, 50) im allgemeinen embryonales oder neonatales Gewebe verwendet.

Hier soll nur auf die Oberflächenkulturen aus dissoziierten Einzelzellen eingegangen werden, die in mancher Hinsicht ganz ähnliche Vorteile für die biochemische Analyse bieten wie permanente Zell-Linien des Nervensystems. Derartige Kulturen sind in ihrer morphologischen Entwicklung gut zu beobachten, bieten keine Schwierigkeiten bei der Applikation verschiedener Agentien, können leicht in Replikaplatten gezüchtet werden und ermöglichen so die biochemische Untersuchung in Serienbestimmungen. Wesentliche Nachteile gegenüber permanenten Zell-Linien sind die Heterogenität der Kulturen, die recht zeitraubende Herstellung und die bislang ungenügend standardisierten Kulturbedingungen. Die Heterogenität der Kulturen bietet aber auch Vorteile. So können aus einmal an Kulturbedingungen adaptierten Zellen sehr viel leichter als aus dem intakten Organ Suspensionen lebensfähiger Einzelzellen hergestellt werden, die dann Zelltrennungsvorfahren unterworfen werden könnten (siehe Abschnitt 1.2 und 2.7).

Primärkulturen dissoziierter Einzelzellen wurden aus Ganglien (dorsale Wurzel Ganglien, sympathische Ganglien, obere Zervikal-Ganglien) (51-105), aus dem Rückenmark (84, 86, 106-108) sowie aus dem Gehirn und seinen Teilen gewonnen (109-120). Ein Großteil der Literatur auf diesem Gebiet ist der Optimierung der Kulturbedingungen sowie der morphologischen Charakterisierung der Kulturen gewidmet (51-64, 109-115).

Ganglien-Kulturen enthalten einen hohen Anteil von Neuronen. Deren Überleben und morphologische Differenzierung in Kultur wird stark beeinflusst vom K^+ -Gehalt des Mediums (56-58), der Anwesenheit von nicht-neuronalen Zellen (65-67) sowie vom Zusatz von Nervenwachstumsfaktor (68). Ganglien-Kulturen eignen sich daher zum Studium des Mechanismus des Neuritenwachstums (69-80), der elektrischen (55, 66, 81-87) und chemischen (88) Erregbarkeit von Nervenzellen, sowie -vor allem in Kokulturen mit Rückenmarkszellen- zur Untersuchung der Synapsenbildung (63, 84, 86, 89). Die Möglichkeit, Neuronen bzw. nicht-neuronale Zellen durch selektive Plattierungstechniken (59, 60, 90) sowie selektive Wachstumsmedien (91, 92) spezifisch anzureichern, erlaubt eine Untersuchung der Interaktion beider Zelltypen (92-94).

Eine biochemische Untersuchung von Ganglien-Kulturen wird stark von der arbeitsintensiven Dissektionstechnik und der daher begrenzten Materialmenge behindert. Daher werden im wesentlichen histochemische (91, 95-97) und autoradiographische (98-102) Techniken verwendet sowie der Einbau radioaktiver Verbindungen gemessen (91-94, 103-105). Derartige Studien zeigten die Anwesenheit von AcChE, MAO und Glutamatdehydrogenase (95, 96), die Synthese von RNS (99, 105) und DNS (98), die Aufnahme von Katecholaminen (100-101) sowie die Anwesenheit cholinergischer Rezeptoren (102) in Ganglien-Zellen.

Die Fähigkeit reiner Neuronenpopulationen aus sympathischen Ganglien zur Synthese von Katecholaminen entwickelt sich in vitro qualitativ ähnlich wie in vivo (91, 103, 104). Aufnahme, Speicherung und Ausschüttung von Noradrenalin konnten ebenfalls nachgewiesen werden (94). Nicht-neuronale Zellen induzieren in diesen Neuronen die Synthese von AcCh (92) durch Konditionierung des Wachstumsmediums (94). Neuronen dagegen stimulieren die Proliferation der nicht-neuronalen Zellen. Dieser Effekt scheint nicht über das Wachstumsmedium vermittelt zu werden (93).

Kulturen des Rückenmarks dienten bislang im wesentlichen zum Studium der Synapsenbildung in Kokulturen mit Muskel- (Übersichtsartikel: 106-108) oder Ganglien-Zellen (84, 86, 89).

Primärkulturen des Gehirns oder von den Hirnteilen eignen sich wegen der einfacheren Dissektionsverfahren und der größeren Menge an zur Verfügung stehendem Material wesentlich besser zu biochemischen Untersuchungen als Ganglien- oder Rückenmarkskulturen. Morphologisch bieten alle beschriebenen Kulturen (109-120) ein ähnliches Bild: Auf einer Schicht von rasch proliferierenden nicht-neuronalen Zellen (mutmaßliche Glioblasten) (111, 112, 114) siedeln sich Neuronen sowie weitere, nicht näher identifizierte "phasendunkle" Zellen (119) an. An Neuronen angereicherte Kulturen konnten erhalten werden durch:

- 1) Differentielle Plattierung (112),
- 2) selektive Vergiftung proliferierender Zellen (116),
- 3) Verwendung junger Embryonen (111, 121),
- 4) Verwendung speziell beschichteter Kulturschalen (111, 122),
- 5) Variation des Wachstumsmediums (109, 115, 123).

Die Gewinnung reiner Neuronen-Kulturen aus dem Gehirn gelang bisher jedoch nicht, da Gliazellen für das Überleben und die

morphologische Differenzierung von Nervenzellen notwendig zu sein scheinen (121). Dagegen können hochangereicherte Kulturen nicht-neuronaler Zellen durch geeignete Wahl des Ausgangsgewebes und der Kulturbedingungen ohne Schwierigkeiten erhalten werden (111, 112, 121).

Eine Substanz, die auf die Neuronen des Gehirns eine ähnliche trophische und differenzierende Wirkung hätte wie der NGF auf Neuronen in Ganglien-Kulturen (65-68) wurde bislang nicht gefunden. Allerdings sind einige Effekte von NGF auf Neuronen in Kultur (109, 124, 125) und in vivo (126, 127) berichtet worden. Diese Effekte können aber auch auf eine Nachahmung eines anderen, noch unbekannten Hirnfaktors durch NGF zurückzuführen sein (124).

Extrakte aus embryonalem und neonatalem (128, 129) sowie aus adultem (130, 131) Gehirn bewirken morphologische Differenzierung von Neuroblasten (128, 129) sowie Astroblasten (130, 131). Eine ähnliche Wirkung haben Monobutyl- (132) und Dibutyl-cAMP (130) auf Astroblasten.

Elektrophysiologische Untersuchungen an neuronreichen Kulturen zeigen, daß die kultivierten Nervenzellen zur Generation von Aktionspotentialen und zu Synapsenbildung fähig sind (116, 133, 134). Die Aktivität verschiedener Enzyme, die die Synthese oder den Abbau von Neurotransmittern katalysieren, wurden in Primärkulturen aus Hühnerembryonen (118, 135, 136) sowie aus foetalen oder neonatalen Mäusen und Ratten (117, 119, 137-141) gemessen. Während CAT- (117, 119, 135-137, 139) und GAD- (117, 138) Aktivitäten während der Zeit der Zellen in Kultur zunehmen, ist eine Abnahme von AcChE zu beobachten (137, 117, 118, 136, 137). Auch MAO und COMT-Aktivitäten wurden bestimmt (117, 140). Variation der Kulturbedingungen (137) sowie morphologische Differenzierung durch Monobutyl-cAMP beeinflussen die Aktivitäten von CAT, AcChE und GAD (132, 137, 138).

Die Aktivitäten der neuronalen "Marker"-Enzyme in Oberflächenkulturen sind wesentlich geringer als im intakten Gehirn (117-119, 135, 137, 138). Dagegen wurden wesentlich höhere Aktivitäten in reaggregierenden Kulturen gemessen (141). Dies könnte vor allem darauf zurückzuführen sein, daß in Oberflächenkulturen eine schnelle Proliferation der Glioblasten stattfindet und damit das Verhältnis von Glia- zu Nervenzellen stark zu Gunsten ersterer verschoben wird. Im Einklang mit einer solchen Interpretation ist die Tatsache, daß Eigenschaften von Gliazellen wie die Induzierbarkeit der cytoplasmatischen Glycerinphosphat-Dehydrogenase durch Hydrocortison (120) und die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel durch Katecholamine (142) in dissoziierten Oberflächenkulturen stärker ausgeprägt sind als in reaggregierenden Kulturen (143, 144) oder in vivo (145). In dieser Hinsicht zeigen Primärkulturen eine gewisse Verwandtschaft zu kultivierten Gliomazellen (28-30, 32, 39). Für einen großen Anteil an Gliazellen in Primärkulturen des Gehirns spricht auch der hohe Gehalt an astrocyten-spezifischem (40) GFA-Protein (146).

Kulturen nicht-neuronaler Hirnzellen lassen sich durch Verwendung perinataler Embryonen und unter entsprechenden Kulturbedingungen praktisch frei von Neuronen gewinnen (111, 121). Eine Reihe von Autoren verwenden daher solche Kulturen als Modellsystem zum Studium der Eigenschaften untransformierter Gliazellen (146-156). Wie auch transformierte Gliazellen (19, 153, 157-159) akkumulieren derartige Kulturen GABA (151), Glutamat (148, 151) und Taurin (147) und haben eine gegen Ouabain sensitive Na^+, K^+ -ATPase (150, 153). Ein Vergleich der biochemischen Eigenschaften dieses Glia-Modellsystems mit denen neuronreicher Kulturen könnten wertvolle Informationen über die Wechselwirkung von Glia- und Nervenzellen liefern (149, 155, 156).

Alle hier diskutierten Modellsysteme bieten spezielle Vorteile für die Untersuchung unterschiedlicher Problem-bereiche, unterliegen aber auch jeweils sehr charakteristischen Einschränkungen in der Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse:

Die intrazellulären Mechanismen, die zur phänotypischen Ausprägung einer bestimmten Luxusfunktion einer Zelle führen, sind optimal an permanenten Zell-Linien zu untersuchen. Es ist kaum anzunehmen, daß Tumorzellen zur Realisierung dieser Funktion völlig neue Gene zur Verfügung stehen. Die Regulation von Luxusfunktionen könnte aber in Tumorzellen wesentlich gestört sein. Daher müssen Daten zur Regulation von Luxusfunktionen immer an untransformierten Zellen überprüft werden. Eine mögliche Alternative könnte allerdings in Zellen gefunden werden, deren Transformierung beliebig an- und abschaltbar wäre. So könnten etwa Zellen, die mit temperatursensitiven Virusmutanten infiziert sind, bei der permissiven Temperatur in großen Mengen gezüchtet und bei der nicht permissiven Temperatur, im "differenzierten" Zustand, untersucht werden (160-163).

Nicht-transformierte Zellen des Nervensystems sind bislang nur als heterogene Populationen zugänglich. Dies begrenzt die Aussagekraft der an solchen Kulturen gewonnenen Daten. Eine grobe Fraktionierung in Glia- und Neuronen-Subpopulationen hat schon zu einer Reihe interessanter Erkenntnisse zur Interaktion dieser beiden Zellklassen geführt (92-94, 121). Eine weitere Auftrennung dieser beiden Subpopulationen dürfte das Hauptproblem weiterer Forschung darstellen. Insbesondere bleibt zu beachten, daß Kulturbedingungen, die eine Proliferation der Zellen erlauben, immer ein Selektionssystem auf schnell proliferierende Zellen darstellen. Damit ist bei dünn angesäten Kulturen oder gar mehrfacher Subkultivierung immer zu befürchten, daß Zellen dedifferenzieren und/oder die Kultur durch andere

Zelltypen (z.B. Fibroblasten) überwachsen wird. Zum Beispiel wird die nervensystem-spezifische Induzierbarkeit der Glycerinphosphat-Dehydrogenase durch Hydrocortison in sehr dünn angesäten Primärkulturen nicht mehr beobachtet. Damit einher geht ein Verlust an morphologischer Differenzierung (120). Mehrfach subkultivierte primäre Hirnzellkulturen enthalten kein GFA-Protein mehr (19), das in nicht subkultivierten Primärkulturen dagegen in großen Mengen vorhanden ist (146). Eine weitere Schwierigkeit ist der mögliche Verlust differenzierter Funktionen mangels differenzierender und/oder trophischer Stimuli, die ein wesentliches Element interzellulärer Wechselwirkung verschiedener Zelltypen darstellen könnten. Dies bedeutet, daß vor dem Versuch einer Fraktionierung differenzierter Zellen in Kultur ein Satz von "Differenzierungsmarkern" zur Verfügung stehen muß, der eine Entscheidung darüber erlaubt, ob eine bestimmte Zellklasse angereichert wurde.

1.2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit Primärkulturen des Gehirns als Ausgangssystem zur Gewinnung möglichst einheitlicher Subpopulationen nicht-transformierter Hirnzellen dienen können. Eine solche Anreicherung müßte in folgenden Schritten vor sich gehen:

- 1) Etablierung eines verlässlichen Kultursystems, das die biochemische Analyse in Reihenuntersuchungen erlaubt;
- 2) Charakterisierung der in gemischten Kulturen beobachtbaren differenzierten Funktionen;
- 3) Untersuchung der Frage, inwieweit sich eine bestimmte Kombination dieser Funktionen einer Subpopulation von Zellen zuordnen läßt;
- 4) Entwicklung eines Verfahrens, das die Anreicherung von Zellpopulationen gemäß des vorher bestimmten Satzes an biochemischen "Markern" erlaubt;
- 5) Fraktionierung des Zellgemisches unter Kontrolle auf Anreicherung der Eigenschaften des gewünschten Zelltyps und Abreicherung der Eigenschaften aller übrigen Zelltypen.

Als Modellsystem zum Studium dieser Probleme werden Kulturen verwendet, die im wesentlichen aus nicht-neuronalen Zellen bestehen (111). Primärkulturen nicht-neuronaler Zellen haben den Vorteil, nur eine begrenzte Anzahl unterschiedlicher Zelltypen zu enthalten. Größere Mengen von Replikaplaten für biochemische Serienmessungen lassen sich relativ leicht herstellen.

Die Sensitivität solcher Kulturen gegen eine Reihe von Neurohormonen wird untersucht und mit den Eigenschaften von Gliomazellen verglichen. Die Möglichkeit, einen be-

stimmten Satz von Hormonrezeptoren einem Zelltyp zuzuordnen, wird unter dem Aspekt der spezifischen Identitätsmarkierung von Zellen in gemischten Kulturen diskutiert. Über vorbereitende Arbeiten zum Studium von Kulturen neuronaler Hirnzellen sowie zur Entwicklung eines rezeptorspezifischen Anreicherungsverfahrens von Subpopulationen wird berichtet.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Bestimmung cyclischer Nukleotide

Seit der Entdeckung des cyclischen Adenosin-3':5'-monophosphat (cAMP) durch Earl W. Sutherland und Mitarbeiter 1958 (164) stellt die Erforschung der biologischen Funktion der cyclischen Nukleotide eines der bedeutendsten und fruchtbarsten Teilgebiete moderner Hormonforschung dar (165). Änderungen im intrazellulären Gehalt an cAMP und dem später entdeckten cyclischen Guanosin-3':5'-monophosphat (cGMP) (166) sind sowohl mit Wachstum und Differenzierung von Zellen (167) als auch mit der Wirkung bestimmter Hormone korreliert (165). In einigen Fällen konnte die biologische Wirkung des Hormons durch Applikation von cAMP nachgeahmt werden (Übersichtsartikel: 168). Die Ergebnisse solcher Untersuchungen stützen das Konzept einer "second messenger"-Funktion cyclischer Nukleotide: Die Wirkung des Hormons am extrazellulären Rezeptor wird durch die intrazelluläre Bildung von cyclischen Nukleotiden vermittelt. Dieses zunächst von Sutherland et al. (169) für cAMP vorgeschlagene Konzept wurde später auf cGMP ausgedehnt (170). In ihrer "Yin Yang-Hypothese" postulierten Goldberg und Mitarbeiter eine universelle Bedeutung der antagonistischen Wirkungen beider cyclischer Nukleotide für die biologische Regulation (171). Das natürliche Vorkommen und biologische Effekte eines dritten cyclischen Nukleotids (cyclisches Cytidin-3':5'-monophosphat, cCMP) sind berichtet worden (172). Im Bereich des Nervensystems wird vor allem die Rolle der cyclischen Nukleotide beim Prozeß der synaptischen Erregungsübertragung untersucht (Übersichtsartikel: 173).

In dieser Arbeit dient die Messung der intrazellulären Spiegel cyclischer Nukleotide nach Stimulation mit diversen Hormonen und Neurotransmittern zu Lokalisierung

und Charakterisierung von Hormonrezeptoren in Primärkulturen des Gehirns sowie in transformierten Gliazellen.

2.1.1 cAMP-Bestimmung

Zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehaltes wird in dieser Arbeit die von Gilman entwickelte Isotopenverdünnungsmethode (174) in der Modifikation von Traber (175) verwendet. Das aus Rindermuskel isolierte Bindungsprotein (siehe Abschnitt 3.4.1) entsprach völlig dem von Traber (175) beschriebenen.

2.1.2 cGMP-Bestimmung

Die cGMP-Messungen dieser Arbeit wurden mit einem Isotopenverdünnungstest durchgeführt, der in Zusammenarbeit mit der Firma Boehringer/Mannheim entwickelt wurde (176). Das verwendete Bindungsprotein aus dem Fettkörper von Seidenspinnerraupen (*Bombyx mori*) wurde entweder von Boehringer zu Testzwecken zur Verfügung gestellt oder nach der Methode von Kuo und Greengard (177, 178) selbst präpariert (siehe Abschnitt 3.4.2).

2.1.2.1 Meßbereich der cGMP-Bestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtmeßbereiches des cGMP-Tests wurde eine Eichkurve im Bereich von 0-20 pMol cGMP aufgenommen. Die Eichkurve verläuft bis zu 16 pMol linear (Abb. 1). Mit I_0 ist diejenige Radioaktivitätsmenge bezeichnet, die an das Bindungsprotein gebunden wird, wenn nur ^3H -cGMP eingesetzt wird ("Null-Standard"). I_x bezeichnet die Radioaktivität, die gebunden wird, wenn zusätzlich die in der Abszisse angegebene Menge an unmarkiertem cGMP im Testansatz anwesend ist.

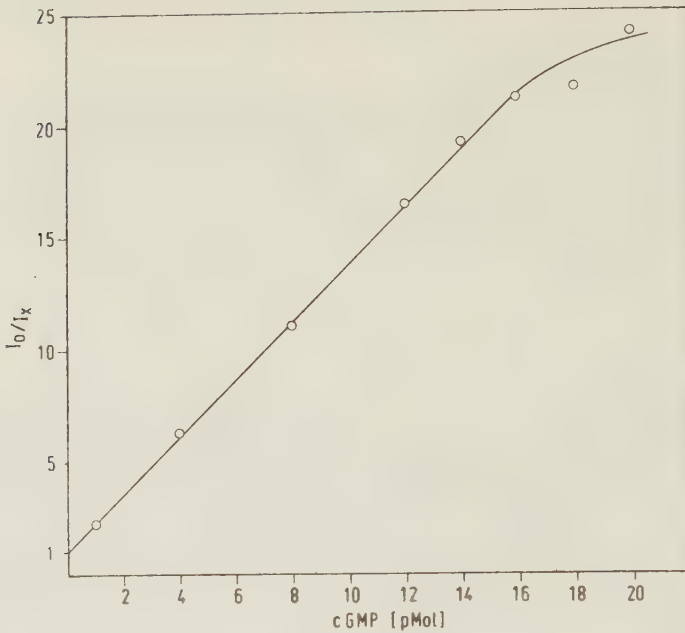


Abb. 1 Eichkurve zur Bestimmung von cGMP: Gesamtmeßbereich (Mittelwerte aus Triplikaten)

Abb. 2 zeigt eine Eichkurve im normalerweise wichtigsten Meßbereich bis 2 pMol (Mittelwerte aus Triplikaten). Bei cGMP-Mengen unter 0.2 pMol werden keine signifikanten Abweichungen vom I_0 -Wert mehr erhalten.

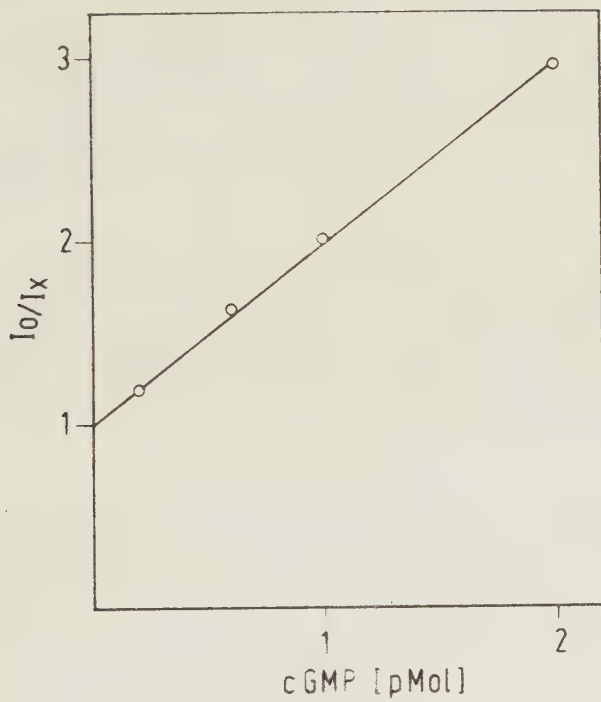


Abb. 2 Eichkurve zur Messung von cGMP (Mittelwerte aus Triplikaten).

2.1.2.2 Zuverlässigkeit und Richtigkeit in Serienbestimmungen

Um eine Übersicht über die Zuverlässigkeit der Einzelmessung und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bekommen, wurde eine Serienmessung von 15 Proben zu 0.2 und 1.0 pMol sowie 12 Proben zu 2.0 pMol durchgeführt (Tab. 1, Exp. 1).

Tab. 1 Zuverlässigkeit der cGMP-Bestimmung in Serienmessungen. Exp. 1: Messungen mit einer Eichkurve an einem Tag. Exp. 2: Messungen an 15 verschiedenen Tagen mit jeweils neu aufgenommenen Eichkurven (Duplikate). Die Mittelwerte der 15 Doppelbestimmungen wurden gemittelt.

Exp. Nr.	cGMP eingesetzt pMol	cGMP gemessen Mittelwerte $\pm$ S.A. pMol	Anzahl der gemittelten Werte
1	0.2	0.12 $\pm$ 0.06	15
	1.0	0.97 $\pm$ 0.18	15
	2.0	1.97 $\pm$ 0.20	12
2	0.2	0.21 $\pm$ 0.05	15
	0.6	0.65 $\pm$ 0.13	15

In einer weiteren Serienmessung wurde überprüft, welche Streuungen der Ergebnisse bei täglicher Wiederholung der Messung beobachtet werden (Aufbewahrung der Lösungen bei -20°C). Dazu wurden an 15 aufeinanderfolgenden Tagen je eine Eichkurve im Konzentrationsbereich bis 2 pMol aufgenommen und jeweils Proben zu 0.2 pMol und 0.6 pMol cGMP gemessen (Doppelbestimmungen) (Tab. 1, Exp. 2). Diese Serienmessungen zeigen, daß cGMP-Mengen von 0.6 bis 2.0 pMol mit zufriedenstellender Zuverlässigkeit (Standardabweichungen

10-20%) gemessen werden können. Die Messung geringerer Mengen ist problematisch. In dieser Arbeit wurden daher im allgemeinen mindestens 0,5 pMol cGMP pro Testansatz eingesetzt.

2.1.2.3 Bindekapazität des cGMP-Bindungsproteins: Einfluß von Einfrieren bzw. Auftauen

Die Streuung der Null-Standardwerte I_0 (Duplikate) während der Serienbestimmungen (siehe Abschnitt 2.1.2.2) ist in Tab. 2 nach der Anzahl der Einfrier- Auftaucyklen aufgeschlüsselt, denen das Bindungsprotein ausgesetzt war. Ein signifikanter Einfluß des Einfrierens und Auftauens auf die Bindekapazität des Bindungsproteins ist nicht zu erkennen.

Tab. 2 Bindekapazität des cGMP-Bindungsproteins: Streuung der Null-Standardwerte und Einfluß von Einfrieren bzw. Auftauen. Das von Boehringer als Lyophilisat bezogene Bindungsprotein wurde in Wasser gelöst und entweder sofort oder nach Aufbewahrung bei -20°C und Auftauen in den Test eingesetzt. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Anzahl der gemittelten Werte (jeweils Mittelwerte aus Duplikaten).

Häufigkeit des Auftauens	^3H -cGMP gebunden (cpm) Mittelwerte $\pm$ S.A.
0	1700 $\pm$ 230 (4)
1	1590 $\pm$ 320 (8)
2	1490 $\pm$ 220 (3)
3	1480 $\pm$ 320 (2)

2.1.2.4 Störung des Tests durch Nukleosid-Derivate

Messungen der Firma Boehringer/Mannheim hatten ergeben, daß die Anwesenheit von je 50 pMol Guanin, Guanosin, GDP, G-2':3'-MP, GMP oder Desoxy-G-3':5'-MP den Test nicht beeinflußt. 100 pMol GTP täuschen 0.3 pMol cGMP im Test vor. Die Störung des Testes durch cAMP ist dagegen größer: 50 pMol cAMP täuschen 1.7 pMol cGMP, 100 pMol cAMP 2.3 pMol cGMP im Test vor (176).

Das in dieser Arbeit präparierte Bindungsprotein wurde daher zum Qualitätsvergleich lediglich auf Kreuzreaktion mit cAMP untersucht. Tab. 3 zeigt, daß die Störanfälligkeit des Tests unter Verwendung dieses Proteins geringer ist als die mit dem von Boehringer/Mannheim bezogenen (vgl. die Daten für 50 pMol cAMP). Sie ist aber dennoch so gravierend, daß cAMP vor dem Test quantitativ abgetrennt werden muß. Erst cAMP-Mengen geringer als 5 pMol pro cGMP-Testansatz können toleriert werden (Nachweisgrenze cGMP: 0.2 pMol, siehe Abschnitt 2.1.2.1).

Tab. 3 Störung des cGMP-Testes durch cAMP. Bekannte Mengen einer cAMP-Stammlösung wurden im cGMP-Test statt cGMP-Proben gemessen (Triplikate, Mittelwerte $\pm$ S.A.).

cAMP im Test (pMol)	cGMP vorgetäuscht (pMol)
5	0.30 $\pm$ 0.08
25	0.64 $\pm$ 0.03
50	0.88 $\pm$ 0.02

2.1.2.5 Bestimmung von cGMP in Zellextrakten: Proportionalität und Wiederfindung

Der cGMP-Test wurde mit zwei Verfahren auf mögliche Störungen durch kreuzreagierende Substanzen geprüft. Im Test auf "Proportionalität" wird untersucht, ob die gemessene Menge der zu bestimmenden Substanz der eingesetzten Probenmenge proportional ist. Eine nicht-lineare Beziehung zwischen Probenmenge und gemessener Menge ist ein Indiz für eine Störung des Testes. So führt zum Beispiel eine Verfünffachung der cAMP-Menge nur zu einer Verdoppelung der vorgetauschten cGMP-Menge (Abschnitt 2.1.2.4, Tab. 3). Im Test auf "Wiederfindung" werden bekannte Mengen der zu messenden Substanz der unbekannten Probe zugesetzt. Der erhaltene Meßwert muß der Summe aus Probe und Zusatz entsprechen.

Das Ergebnis eines Testes auf Proportionalität und Wiederfindung unter Verwendung des nach Abschnitt 3.4.2 gewonnenen cGMP-Bindungsproteins und eines gereinigten Extraktes (Abschnitt 3.4.3 und 3.4.4) aus unstimulierten C6-BU-1-Gliomazellen ist in Tab. 4 dargestellt.

Die gemessenen cGMP-Werte sind, im Rahmen der erreichbaren Meßgenauigkeit (Abschnitt 2.1.2.2), proportional zu den eingesetzten Extraktmengen. Zugewetztes cGMP (1 pMol) erhöht den cGMP-Gehalt der Proben wie erwartet um 1 pMol.

Tab. 4 Bestimmung von cGMP in einem Zellextrakt aus C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 25; Test auf Proportionalität und Wiederfindung. Die lyophilisierten cGMP-Fractionen aus 2 Replikplatten wurden in 200 μ l H_2O aufgenommen. 7.8 mg Protein, 5.5×10^7 Zellen pro Platte, Lebensfähigkeit 99%, Mittelwerte aus Triplikat-Bestimmungen $\pm$ S.A.

Zellextrakt μ l	cGMP-Zusatz pMol	cGMP gemessen pMol	Platte Nr.
20	-	0.3 ± 0.1	1
40	-	0.7 ± 0.1	1
80	-	1.5 ± 0.3	1
20	1.0	1.5 ± 0.1	2
40	1.0	1.7 ± 0.2	2
80	1.0	2.3 ± 0.2	2
-	1.0	0.9 ± 0.1	2
40	-	0.7 ± 0.1	2

2.2 Primärkulturen des Gehirns

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärkulturen sollten ein Studium der Frage erlauben, inwieweit gemischte Populationen von Zellen biochemisch so charakterisiert werden können, daß eine gerichtete Isolierung von Subpopulationen mit einem bestimmten Satz von Luxusfunktionen möglich wird. Die Kulturen mußten daher folgenden Ansprüchen genügen:

- 1) Ausprägung möglichst vieler differenzierter Eigenschaften in Kultur,
- 2) Begrenzung der Heterogenität der Kulturen, um die Zuordnung einer beobachteten Eigenschaftskombination zu einem Zelltyp zu ermöglichen.

Beide Forderungen widersprechen einander. Es wurde daher ein Kompromiß gewählt:

Nicht-neuronale Zellen aus dem Gehirn lassen sich unter bestimmten Bedingungen (Verwendung perinataler Tiere, lange Kulturdauer) nahezu frei von Neuronen kultivieren und zeigen auch dann noch eine Reihe differenzierter Eigenschaften (111, 146-156). Neuronen aus dem Gehirn dagegen benötigen in Kultur den trophischen und differenzierenden Einfluß der Gliazellen (121, 123). In dieser Arbeit werden derartige Kulturen nicht-neuronaler Zellen (111) verwendet. Sie werden aus dem Gehirn perinataler Mäuse gewonnen und in der Regel 22-26 Tage kultiviert. Kulturen aus neonatalen Mäusen erwiesen sich sowohl nach morphologischen (vgl. Abschnitt 2.2.1) als auch nach biochemischen (Spiegel cyclischer Nukleotide nach Hormonstimulation) Kriterien als identisch mit Kulturen aus Embryonen (19-21 Tage in utero). Auf die Möglichkeit, durch Subkultivierung der Zellen noch einheitlichere Populationen zu gewinnen, wurde verzichtet, um einen möglichen Verlust von Luxusfunktionen zu vermeiden (vgl. oben, Forderung 1 und "Einleitung"). Zur Charakterisierung der Kulturen sollte vor allem die Anwesenheit und Interaktion bestimmter Hormonrezeptoren gemessen werden, deren

Stimulierung die Spiegel cyclischer Nukleotide in den Zellen beeinflusst. Die Kulturen stellten wir nach Gilman und Schrier (142) her, um die Ergebnisse mit denen dieser Autoren vergleichen zu können. Diese Technik unterscheidet sich nicht wesentlich von der anderer Autoren (111).

Einige Modifikationen der Methode wurden vorgenommen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Eignung zu Serienmessungen zu verbessern:

- 1) Die Zellen wurden bis zum ersten Mediumwechsel 6 Tage inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt haftet der Großteil der Zellen am Boden der Kulturschale.
- 2) Die Zellen werden anschließend ohne weiteren Wechsel des Mediums bis zum Verwendungstag inkubiert. Für diese Modifikation der Technik waren folgende Beobachtungen ausschlaggebend:
 - a) Die Lactat-Produktion der Zellen ist nach Erreichen der Konfluenz so gering, daß sich der pH-Wert des Wachstumsmediums kaum ändert.
 - b) Mediumwechsel schien einen proliferationsstimulierenden und dedifferenzierenden Einfluß zu haben.
 - c) C6-BU-1-Gliomazellen und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen zeigen bei längerer Inkubation ohne Mediumwechsel eine Tendenz zur morphologischen Differenzierung (Auswachsen von Fortsätzen) (179). Gliomazellen, die unter diesen Bedingungen kultiviert werden, weisen nach Inkubation mit NA wesentlich höhere cAMP-Spiegel auf als normal kultivierte Zellen (180).
 - d) Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen, die durch DBCA-Behandlung morphologisch differenziert sind, zeigen nach Mediumwechsel eine deutliche Tendenz zur Dedifferenzierung (181).

Die Zellen scheinen also einen differenzierenden Faktor zu produzieren und/oder einen proliferationsstimulierenden und dedifferenzierenden Faktor im Serum zu verbrauchen (siehe dazu auch Abschnitt 2.7.2).

2.2.1 Morphologie: Entwicklung der Kulturen

Die morphologische Entwicklung der in dieser Arbeit verwendeten Kulturen verläuft ganz ähnlich wie in den von anderen Autoren beschriebenen (109-120).

Nach der Dissoziation des Hirngewebes durch Pressen durch ein Nylonnetz liegt im wesentlichen eine Einzelzellsuspension vor. Die Lebensfähigkeit der Zellen (Ausschluß von Nigrosin) beträgt im allgemeinen 50% und mehr. In seltenen Fällen wurden aus ungeklärten Ursachen Präparationen geringerer Lebensfähigkeit erhalten. Sie wurden nicht verwendet. Innerhalb weniger Stunden nach dem Ansäen bilden sich Aggregate von schätzungsweise mehreren hundert Zellen, während nur wenige Zellen sich am Plattenboden anhaften und eine epitheloide Morphologie annehmen. Letztere beginnen zu proliferieren. Auf ihnen haben sich nach einer Kulturzeit von 6 Tagen Aggregate festgesetzt, die über Fortsätze miteinander Kontakt aufnehmen (Abb. 3A). In sich auflösenden Aggregaten sind viele, häufig bipolare Zellen zu erkennen, die aus den Aggregaten auszuwandern und sich auf der Schicht epitheloider Zellen festzusetzen scheinen (Abb. 3B). Morphologisch ähneln einige Zellen reifen Astrocyten (Abb. 3A).

Nach etwa 10-14 Tagen erreichen die Kulturen Konfluenz. Sie bestehen jetzt aus einer dichten Schicht von Untergrund-Zellen meist epitheloider Morphologie, auf der sich viele phasendunkle, wesentlich kleinere Zellen festgesetzt haben (Abb. 3C). An diesen "phase-dark cells" (119) sind häufig auch Fortsätze zu erkennen. Möglicherweise sind diese Zellen

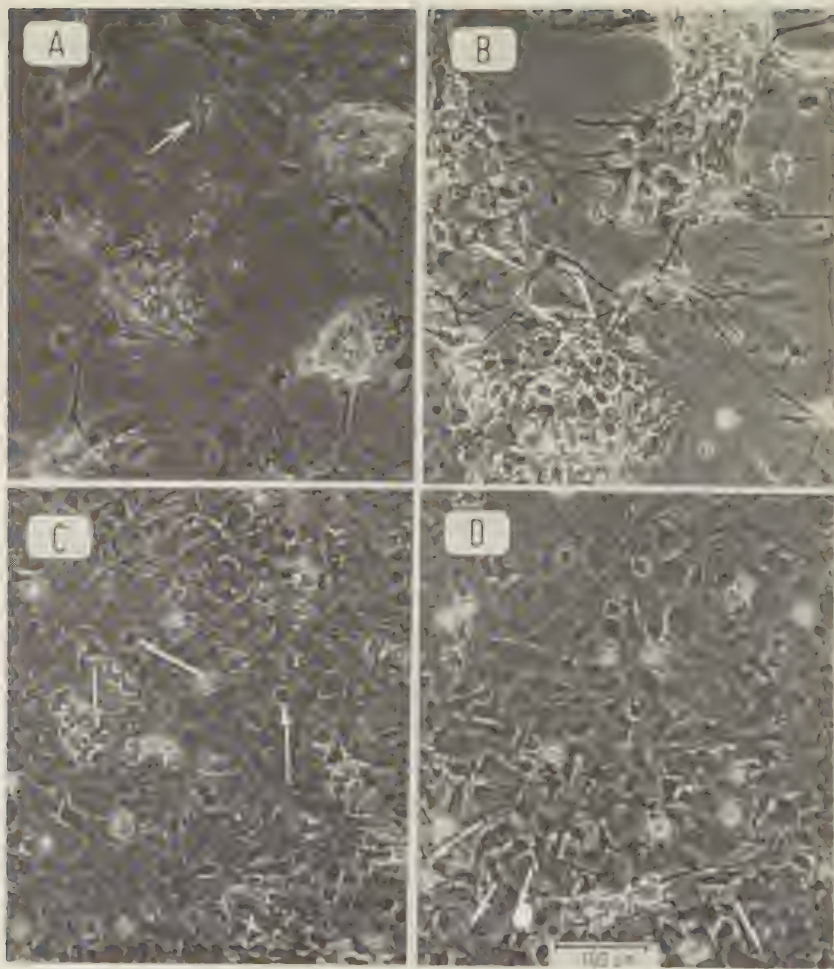


Abb. 3 Morphologische Entwicklung von Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse
 A: 6. Tag; Zellaggregate auf epitheloider Untergrundschicht; Pfeil: mutmaßlicher Astrocyt.
 B: 6. Tag; Aggregate in Auflösung; Pfeile: Auswandernde Zellen.
 C: 13. Tag; Pfeile: "Phase dark cells"
 D: 29. Tag; Pfeile: Vakuolisierte Stellen, Zellen mit Zilien.

identisch mit den schon nach 6 Tagen (vgl. Abb. 3B) beobachtbaren bipolaren Zellen, die aus sich auflösenden Aggregaten zu stammen scheinen. Diese Morphologie der Kulturen bleibt bis zum Alter von 4-5 Wochen erhalten (Abb. 3D). Ab etwa dem 10. Tag in Kultur sind an einigen Stellen Zellen mit aktiv schlagenden Zilien zu beobachten. Diese Stellen sind immer stark vakuolisiert, auch dunkle Granula sind zu erkennen. Die Zahl dieser Zellen nimmt mit dem Alter der Kultur zu (vgl. Abb. 3D). In seltenen Fällen können auch noch große Zellen mit langen Fortsätzen vorhanden sein, bei denen es sich wohl um Neuronen handelt. Wenn nach 4-5 Wochen das Medium erneuert wird, können die Zellen noch weiter kultiviert werden (Kulturen waren im Alter von 8 Wochen noch voll lebensfähig). Allerdings nimmt die Zahl differenzierter Zellen stark ab und die Unterschicht wird zunehmend dünner. Jetzt werden häufig auch Stellen mit exakt hexagonalem Plattenepithel beobachtet.

Die Frage, welche Typen nicht-neuronaler Zellen in solchen Kulturen vertreten sind, läßt sich nicht vollständig beantworten. Ependymalzellen sind leicht an ihren schlagenden Zilien zu identifizieren. Hexagonale Epithelzellen werden nur in sehr alten Kulturen aufgefunden und könnten durch Differenzierung aus pluripotenten Stammzellen entstanden sein. Mutmaßliche Astrocyten werden nur in jungen Kulturen beobachtet (Abb. 3A), da in älteren, konfluenten Kulturen die typische Struktur ihrer Fortsätze im eng verfilzten Gewebe der Zellen nicht erkannt werden kann. Der verglichen mit neonatalem Gehirn stark angereicherte Gehalt solcher Kulturen an astrocytenspezifischem (40) GFA Protein (146) spricht aber für ihre Gegenwart auch in älteren Kulturen. Den weitaus größten Anteil von Zellen macht die dichte Unterschicht von Zellen aus, die meist flach und epitheloid sind, zum Teil aber auch Fortsätze haben. Diese Zellen, die nach Behandlung der Kulturen mit Mono- oder Dibutyryl-cAMP oder Hirnextrakten die Morphologie reifer

Astrocyten annehmen (130-132), werden im allgemeinen als Astroblasten angesehen. Untersuchungen an morphologisch ganz ähnlichen Kulturen aus menschlichen Embryonen mit verschiedenen Anfärbetechniken haben sehr wahrscheinlich gemacht, daß es sich bei den flachen, relativ großen Untergrundzellen um Astroblasten, bei den kleineren, ihnen aufgelagerten und zum Teil Fortsätze tragenden Zellen dagegen um Spongioblasten handelt (114).

2.2.2 Wirkung von Neurohormonen auf Primärkulturen

Die einzigen bislang bekannt gewordenen Messungen des Effektes verschiedener Neurohormone auf die intrazelluläre Akkumulation von cAMP in Hirn-Primärkulturen wurden 1972 von Gilman und Schrier (142) durchgeführt. Die Autoren stellten fest, daß die Zellen nach Inkubation mit Katecholaminen, Prostaglandin E_1 und Adenosin einen höheren Gehalt an cAMP aufwiesen als unstimulierte Zellen. Dosis-Wirkungskurven oder Messungen der Effekte von Drogen-Kombinationen liegen aber bisher nicht vor. In dieser Arbeit wurden daher die beschriebenen Effekte näher untersucht sowie die Wirkung einiger anderer Substanzen auf den Spiegel cyclischer Nukleotide geprüft.

2.2.2.1 Adrenerge Agonisten

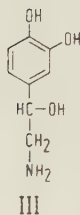
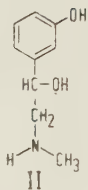
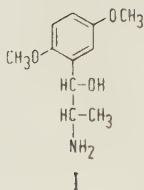
Adrenerge Rezeptoren werden nach der relativen, agonistischen Potenz verschiedener Agonisten (Abb. 4, I-IV) sowie der Wirkung spezifischer Antagonisten (Abb. 4, V-VII) in 2 Klassen eingeteilt (182):

- 1) α -Rezeptoren, die durch synthetische Agonisten wie Phenylephrin und Methoxamin stimuliert werden. Der Effekt wird durch Antagonisten wie Phentolamin oder Phenoxybenzamin blockiert.
- 2) β -Rezeptoren, die durch synthetische Agonisten wie Isopropylarterenol (Isoprotireol, Iprot) stimuliert und durch Antagonisten wie z.B. Propranolol blockiert werden.

Die natürlich vorkommenden adrenergen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin (NA) können beide Rezeptortypen stimulieren.

Die Dosis-Wirkungskurven für den Effekt verschiedener adrenerger Agonisten auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in Primärkulturen zeigt Abb. 5. Alle Inkubationen wurden in der Anwesenheit von 0.5 mM Methylisobutylxanthin (MIBX) durchge-

α -adrennerg



β -adrennerg

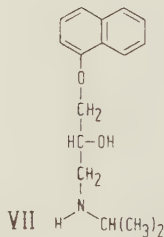
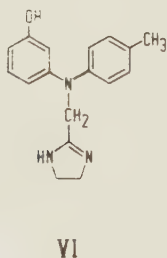
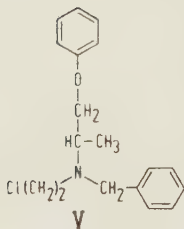
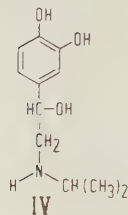


Abb. 4 Adrenerge Agonisten (I-IV) und Antagonisten (V-VII);
 I: Methoxamin; II: Phenylephrin; III: NA; IV: Ipratropium;
 V: Phenoxybenzamin; VI: Phentolamin; VII: Propranolol.

führt. MIBX blockiert den Abbau von cAMP in den Zellen und erhöht dadurch die Wirkung der Hormone (183, 184). Sowohl der β -adrenerge Agonist Iprot (Kurve I) als auch NA (Kurve II) stimulieren die intrazelluläre Akkumulation von cAMP in den Zellen schon bei einer Konzentration von 10 nM, während Dopamin (Kurve III) und der α -adrenerge Agonist Phenylephrin (Legende der Abb. 5) bis zu Konzentrationen von 10 μ M (Dopamin) bzw. 1 μ M (Phenylephrin) ohne Effekt bleiben. Der β -adrenerge Antagonist Propranolol (10 μ M) inhibiert sowohl den Iprot- als auch den NA-Effekt praktisch vollständig, während Phentolamin (ein α -adrenerger Antagonist) nur einen geringen Einfluß auf die Iprot-Wirkung hat (Tab. 5). Die Dosis-Wirkungskurven und die Hemmstudien bestätigen (142) also die β -adrenerge Natur des beteiligten Rezeptors.

Die Dosis-Wirkungskurven zeigen allerdings zwei Besonderheiten:

- 1) Die Dosis-Wirkungskurve für Iprot fällt bei Konzentrationen über 1 μ M wieder ab (Abb. 5, Kurve I).
- 2) Das Maximum der cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit Iprot liegt etwa doppelt so hoch wie die durch NA-Stimulation erreichbaren Werte. Auch wenn die Konzentration an NA das 1000fache der maximalstimulierenden Iprot-Konzentration beträgt (Abb. 5, Kurve II), wird nicht der durch Iprot erreichbare Wert erhalten.

Wenn die Inkubationen dagegen in der Anwesenheit von 10 μ M Phentolamin, einem spezifischen Antagonisten des α -adrenergen Rezeptors, durchgeführt werden (Abb. 6), dann wird:

- 1) der Abfall der Dosis-Wirkungskurve für Iprot bei Konzentrationen über 1 μ M verhindert (vgl. Abb. 6, Kurven II und IV);
- 2) der maximale NA-Effekt auf mehr als das Doppelte gesteigert, (vgl. Abb. 6, Kurven I und III), so daß der durch NA erhöhte cAMP-Spiegel fast die Werte erreicht, die bei optimal

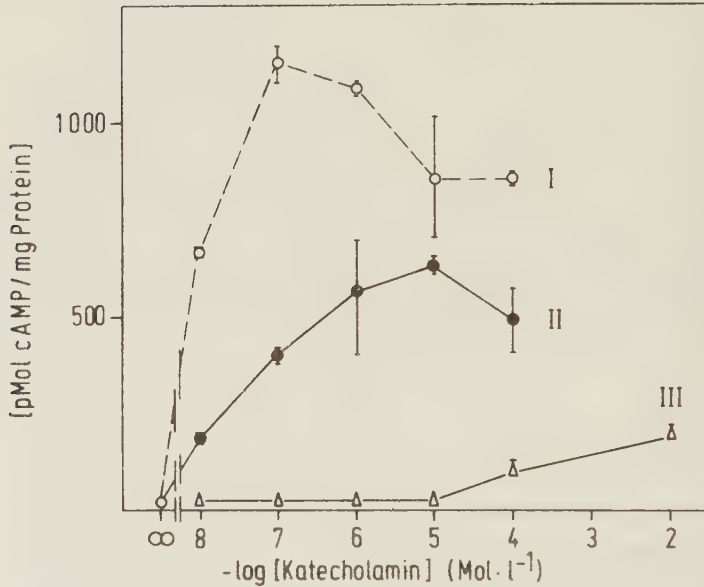


Abb. 5 Dosis-Wirkungskurven für die Effekte von Iprot (Kurve I), NA (Kurve II) und Dopamin (Kurve III) auf die cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus neonatalen Mäusen, 24 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX. Kontrolle in Gegenwart von MIBX: 17 ± 2 pMol cAMP/mg Protein. Inkubation mit Phenylephrin + MIBX (pMol cAMP/mg Protein): 0.01 μ M: 10 ± 3 ; 0.1 μ M: 14 ± 1 ; 1 μ M: 16; 10 μ M: 51; 100 μ M: 89 ± 1 .

wirksamer Iprot-Konzentration gefunden werden (vgl. Abb. 6, Kurve III mit II und IV).

Tab. 5 Propranolol (10 μ M), nicht aber Phentolamin (10 μ M), blockiert die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Iprot (0.1 μ M) oder NA (1 μ M) in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen. Primärkulturen aus perinatalen Mäusen, 24 Tage in Kultur, 0.9 mg (Exp. 1, Kulturschalen 60 mm Durchmesser) bzw. 2,6 mg (Exp. 2, Kulturschalen 85 mm Durchmesser) Protein pro Platte. Phentolamin und Propranolol allein haben keinen Effekt, wie in anderen Versuchen gezeigt wurde, z.B.: MIBX (500 μ M): 25 ± 3 , MIBX + Phentolamin (10 μ M): 27 ± 5 , MIBX + Propranolol (10 μ M): 31 ± 7 (pMol cAMP/mg Protein).

Zusatz (μ M)	cAMP (pMol/mg Protein)	
	Exp. 1	Exp. 2
MIBX (500)	27 ± 2	36
MIBX + Iprot (0.1)	1920 ± 230	-
MIBX + NA (1)	640 ± 60	1140 ± 140
MIBX + Iprot + Propranolol (10)	42 ± 4	-
MIBX + NA + Propranolol (10)	-	45 ± 8
MIBX + Iprot + Phentolamin (10)	1370 ± 150	-
MIBX + NA + Phentolamin (10)	1600 ± 250	2630 ± 290

Dieses Resultat legt nahe, daß

- 1) der bei hohen Konzentrationen von Iprot beobachtete Abfall der Dosis-Wirkungskurve auf die Aktivierung eines α -Rezeptors zurückzuführen ist;
- 2) der Unterschied in der maximalen Wirkung von NA und Iprot durch eine Stimulierung von α -Rezeptoren durch den α - und β -Agonisten NA bedingt ist.

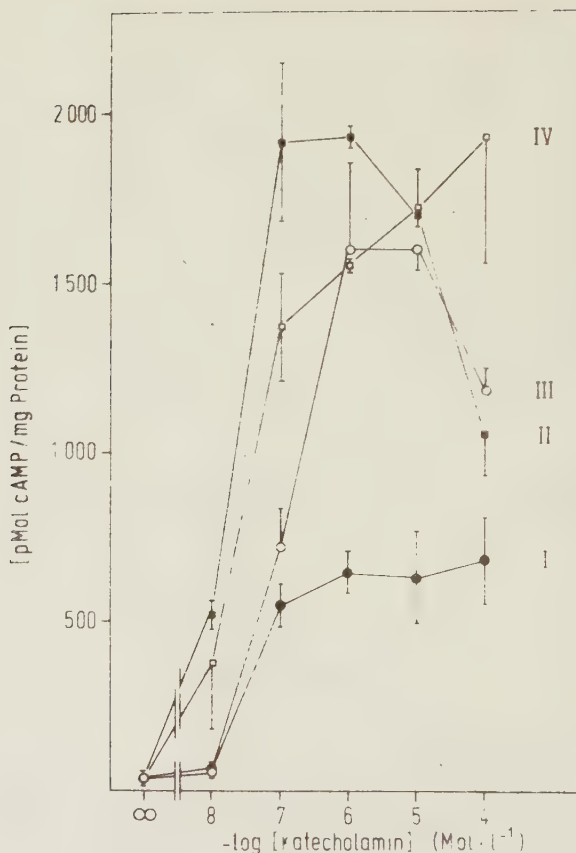


Abb. 6 Erhöhung der cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuroner Hirnzellen durch NA (Kurven I und III) und Iprot (Kurven II und IV) in Abwesenheit (Kurven I und II) oder Anwesenheit (Kurven III und IV) von 10 μ M Phentolamin. Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX. Primärkulturen aus perinatalen Mäusen, 24 Tage in Kultur, 0.9 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Kontrollen (pMol cAMP/mg Protein): Ohne Zusatz, 9 ± 3 ; 0.5 mM MIBX, 28 ± 9 ; MIBX + 10 μ M Phentolamin, 38 ± 2 .

Daß tatsächlich eine Kompetition zwischen NA und Phentolamin am α -Rezeptor für die Erhöhung des NA-Effektes verantwortlich ist, wird auch durch den Abfall der Dosis-Wirkungskurve bei 100 μM in Anwesenheit von 10 μM Phentolamin nahegelegt (10facher Überschuß von Agonist über Antagonist, Abb. 6, Kurve III).

Wenn die Unterschiedlichkeit der Dosis-Wirkungskurven in An- und Abwesenheit von Phentolamin auf der Blockierung eines α -Rezeptors beruht, der einen inhibitorischen Effekt auf die β -adrenerge Stimulierung intrazellulärer cAMP-Akkumulation ausübt, dann sollte die Steigerung des cAMP-Spiegels durch α -Agonisten unterdrückt werden. Das in Abb. 7 dargestellte Experiment zeigt, daß dies der Fall ist: NA unterdrückt in konzentrationsabhängiger Weise die durch 1 μM Iprot hervorgerufene Steigerung des cAMP-Spiegels (Abb. 7, Kurve I). Diesem inhibitorischen Effekt wird durch 10 μM Phentolamin entgegengewirkt. (Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve zu höheren Konzentrationen, Abb. 7, Kurve II).

Die nach Stimulierung mit maximal wirksamer Iprot-Konzentration in Gegenwart von MIBX erhaltenen cAMP-Spiegel schwanken von Versuch zu Versuch zwischen etwa 1000 und 5000 pMol cAMP/mg Protein (vgl. z.B. Abb. 5, Kurve I und Abb. 7). Derartige Variationen im Maximal-Effekt werden auch bei permanenten Zell-Linien beobachtet (33). Die maximale prozentuale Hemmung durch NA schwankt zwischen 50% und 70% des Kontrollwertes.

Auch der synthetische α -Agonist Phenylephrin hemmt die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Iprot. Die Dosis-Wirkungskurven sind allerdings quantitativ schlecht reproduzierbar, zeigen häufig einen biphasischen Verlauf und die Werte streuen zum Teil sehr stark. Einige qualitativ repräsentativen Daten sind in Tab. 6, Exp. 1 aufgeführt. Auch dem Hemmeffekt von Phenylephrin wird durch Phentolamin (10 μM) entgegengewirkt.

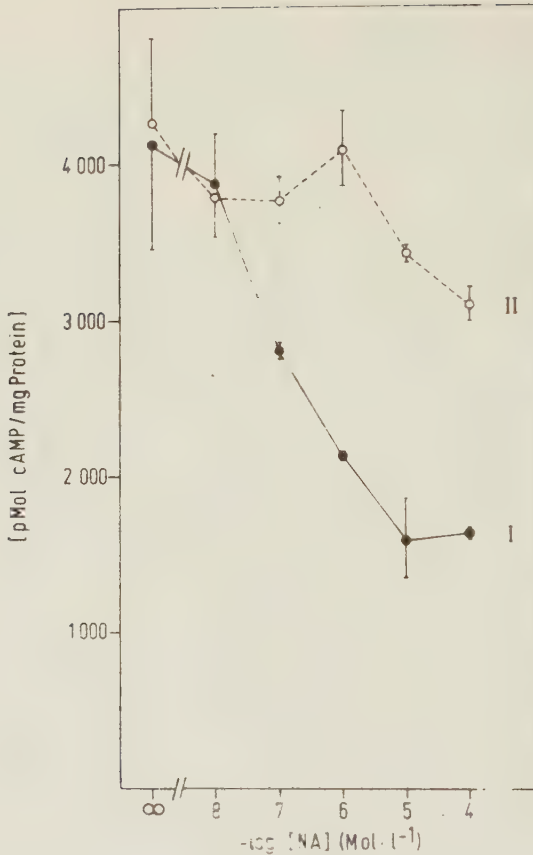


Abb. 7 NA (Kurve I) hemmt die Steigerung der cAMP-Spiegel durch Iprot (1 μ M) in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen. Phentolamin (10 μ M) wirkt dem Effekt entgegen (Kurve II).
 Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX; Primärkulturen aus perinatalen Mäusen, 23 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Die Zellen wurden vor der Inkubation mit den Zusätzen zweimal mit Inkubationsmedium gewaschen. Kontrollen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX (pMol cAMP/mg Protein): keine weiteren Zusätze, 70 ± 9 ; 10 μ M Phentolamin, 68 ± 19 ; 1 μ M NA, 1760 ± 70 ; 1 μ M NA + 10 μ M Phentolamin, 3150 ± 300 .

Tab. 6 Phenylephrin und Methoxamin hemmen die Steigerung des cAMP-Spiegels durch Iprot in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen.
Exp. 1: Replika-Kulturen zu denen der Abb. 7.
Exp. 2: Primärkulturen 24 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

	Zusatz (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)	
		ohne Phentolamin	mit Phentolamin (10 uM)
Exp. 1	MIBX (500)	70 [±] 9	68 [±] 20
	MIBX + Iprot (1)	4120 [±] 680	4100 [±] 550
	MIBX + Iprot + Phenylephrin (1)	3620 [±] 520	3750 [±] 250
	MIBX + Iprot + Phenylephrin (10)	2870 [±] 150	4030 [±] 370
	MIBX + Iprot + Phenylephrin (100)	2500 [±] 170	3610 [±] 70
Exp. 2	MIBX (500)	25 [±] 3	
	MIBX + Methoxamin (1)	31 [±] 4	
	(10)	31 [±] 1	
	(100)	31 [±] 3	
	MIBX + Iprot (0.1)	2360 [±] 250	
	MIBX + Iprot + Methoxamin (1)	1690 [±] 320	
	MIBX + Iprot + Methoxamin (10)	1500 [±] 370	

Ein biphasischer Verlauf der Dosis-Wirkungskurve für Phenylephrin wurde auch an Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen beobachtet, bei denen eine Stimulierung des α -Rezeptors der Erhöhung des cAMP-Spiegels durch PGE₁ entgegenwirkt (185).

In Tab. 6, Exp. 2 sind einige vorläufige Resultate eines Versuches mit dem α -Agonisten Methoxamin dargestellt. Auch Methoxamin verhindert die Steigerung der cAMP-Spiegel durch Iprot. Dagegen hat Methoxamin alleine praktisch keinen Effekt.

Experimente in Abwesenheit des Phosphodiesterase-Blockers MIBX führen zu Ergebnissen, die qualitativ analog zu denen in den Abb. 6 und 7 sowie Tab. 5 und 6 dargestellten sind. Auch unter diesen Bedingungen steigert Phentolamin den Effekt von NA auf mehr als das Doppelte und hemmen die α -Agonisten Phenylephrin und NA die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Iprot (Tab. 7).

Da der inhibitorische Effekt der α -adrenergen Agonisten unabhängig von der Gegenwart des Phosphodiesterase-Blockers MIBX beobachtet wird, repräsentieren die Wirkungen der Katecholamine mit hoher Wahrscheinlichkeit aktivatorische und inhibitorische Einflüsse auf die Adenylatcyclase der gleichen Zelle. Die einfachste Erklärung der erhaltenen Ergebnisse ist daher die Anwesenheit von α - und β -adrenergen Rezeptoren auf derselben Zelle (Zum Problem einer möglichen indirekten Wirkung der α -Agonisten vgl. Abschnitt 2.2.4).

α -adrenerge Effekte sind in einer Reihe verschiedener Systeme mit einem Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels korreliert (165, 186). Berichte, daß Stimulation der α -Rezeptoren zu einem erhöhten cGMP-Gehalt führen sollte, (187-189) schienen die Gültigkeit der "Yin-Yang"-Hypothese von Goldberg und Mitarbeitern (171) zu bestätigen. Die Vermutung war daher naheliegend, daß auch der hier beschriebene cAMP-senkende Effekt α -adrenerger Stimulation mit einem Anstieg des cGMP-Spiegels assoziiert sein könnte. Die Steigerung des intrazellulären cGMP-Spiegels in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen durch NA hatte angeblich folgende Eigenschaften (189):

- 1) Maximale Wirksamkeit von NA schon bei sehr niedrigen Konzentrationen,
- 2) sehr rascher Anstieg des cGMP-Spiegels nach NA-Stimulierung, gefolgt von einem Abfall, so daß schon 1 min wieder Basis-Werte erhalten werden.

Es mußte also mit einer starken Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Effekte gerechnet werden. Daher wurden folgende Versuche durchgeführt, um eine eventuelle Erhöhung des cGMP-Spiegels in Primärkulturen feststellen zu können:

- 1) Inkubation der Kulturen mit 0.1 μ M NA, einer Konzentration, die in der Inhibition des cAMP-Spiegels etwa halbmaximal wirksam ist (vgl. Abb. 7, Kurve I) für 10, 20, 30, 60 sek, 5 min und 10 min. Parallele Inkubationen wurden auch in Anwesenheit von 10 μ M Propranolol oder 10 μ M Phentolamin durchgeführt.
- 2) Inkubation mit 0.1 μ M Phenylephrin für 30 sek und 5 min in An- und Abwesenheit von Propranolol (10 μ M) bzw. Phentolamin (10 μ M).

Bei keinem der Versuche konnte eine signifikante Veränderung des cGMP-Spiegels gegenüber den Kontrollen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, daß etwa eine besonders aktive cGMP-spezifische Phosphodiesterase einen Effekt maskieren könnte, wurden die Kulturen in Anwesenheit eines Inhibitors der cGMP-hydrolysierenden Phosphodiesterase-Aktivität (Ro - 07-2956, (190)) für 30 sek mit steigenden Konzentrationen an NA (0.1 nM bis 10 μ M, Verdünnungsreihe in 1:10 Schritten) inkubiert. Um eine eventuelle Inhibition durch den β -Rezeptor auszuschließen, wurde vor der Hauptinkubation mit 10 μ M Propranolol für 30 sek vorinkubiert. Propranolol war auch während der Hauptinkubation zugegen. Auch unter diesen Bedingungen wurde der cGMP-Gehalt der Kulturen nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt).

Tab. 7 Einfluß α -adrenerger Agonisten und Antagonisten auf den β -adrenerg erhöhten cAMP-Spiegel in Hirnkulturen aus perinatalen Mäusen in Abwesenheit von MIBX. Primärkulturen 27 Tage in Kultur, 2 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser)

Zusatz (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)
Kontrolle	14 [±] 2
Phentolamin (10)	14 [±] 9
NA (1)	170 [±] 12
NA	
+Phentolamin	450 [±] 40
Iprot (0.1)	480 [±] 40
Iprot	
+Phenylephrin (1)	350 [±] 10
Iprot	
+Phenylephrin (10)	250 [±] 20
Iprot	
+Phenylephrin (100)	110 [±] 10
Phenylephrin (10)	17 [±] 1
Iprot	
+NA (0.1)	340 [±] 50
Iprot (0.1)	
+NA (1)	270 [±] 30
Iprot (0.1)	
+NA (10)	260 [±] 40

Der cGMP-Gehalt der Kulturen lag bei allen durchgeführten Versuchen zwischen 0.5 und 1.5 pMol/mg Protein. Abb. 20, Abschnitt 2.3.3 (Messung von cGMP-Spiegeln in C6-BU-1-Gliomazellen nach Inkubation mit Carbamylcholin) ist repräsentativ für die bei solchen als "nicht signifikant" gewerteten Meßergebnissen normalerweise auftretende Streuung der Werte und deren Standardabweichungen.

Da es sehr unwahrscheinlich erschien, daß zwei so verwandte Effekte wie die α -adrenerge Inhibition der cAMP-Akkumulation in Hirnkulturen und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen so unterschiedliche Eigenschaften haben könnten, mußten Kontrollversuche durchgeführt werden, um zu klären, ob mit dem verwendeten Test die berichtete Erhöhung des cGMP-Spiegels in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen durch cholinerge (191) und adrenerge (189) Agonisten sowie Opiate (192-194) reproduziert werden kann. Alle im Rahmen dieser Arbeit dazu durchgeführten Versuche hatten ein negatives Resultat. Nach Inkubation von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen mit NA, Carbamylcholin oder Enkephalin unter den von Gullis (189, 191-193) angegebenen Bedingungen war keine signifikante Änderung des cGMP-Spiegels zu beobachten. Die entsprechenden cGMP-Messungen erwiesen sich inzwischen als frei erfunden (195, 196). Zur Diskussion der Rolle des cGMP siehe Abschnitt 2.4.2.

Neuroblastoma- und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen waren bislang die einzigen aus dem Nervensystem abgeleiteten Zellen, bei denen die aus anderen Systemen bekannte (165, 186) α -adrenerge Hemmung stimulierter cAMP-Akkumulation nachgewiesen werden konnte (185). Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen einen solchen Effekt auch an untransformierten, nicht-neuronalen Hirnzellen. An Hirnschnitten dagegen wurde bisher lediglich eine adrenerg stimulierte Steigerung der cAMP-Spiegel beobachtet, die, variierend mit der Spezies, teils über α -adrenerge, teils über β -adrenerge Rezeptoren vermittelt zu sein schien (197).

Die Gegenwart beider adrenerger Rezeptoren auf derselben Zelle ist schon an exokrinen Zellen in Ratten-Speicheldrüsen (198), an Hepatocyten (199, 200), an einer permanenten Linie vaskulärer Endothelzellen (201) und an Fettzellen (202-204) gezeigt worden. Bei letzteren bewirkt, in gewisser Analogie zu den hier beschriebenen Effekten, eine Aktivierung des α -Rezeptors eine Hemmung der β -adrenerg stimulierten Lipolyse.

Die maximale Stimulation der Adenylatcyclase in Frosch-Erythrocyten durch NA oder Adrenalin erreicht nicht das Ausmaß, das in Gegenwart von Iprot beobachtet wird (205). Dieser "partiell agonistische" (205) Effekt könnte eventuell ebenfalls durch eine simultane Aktivierung von inhibitorischen α -adrenergen und aktivatorischen β -adrenergen Rezeptoren erklärt werden.

Die mögliche biologische Bedeutung einer Kombination beider adrenerger Rezeptoren auf derselben Zelle wird, zusammen mit den Effekten weiterer Hormone, in Abschnitt 2.4 diskutiert.

2.2.2.2 Adenosin und seine Derivate

Adenosin und seine Derivate AMP, ADP und ATP werden als mutmaßliche Neurotransmitter in bestimmten Systemen diskutiert (206, 207). Adenosin hat sowohl stimulierende (183, 208-220) als auch hemmende (220-224) Effekte auf die cAMP-Akkumulation in verschiedenen Geweben.

Eine Dosis-Wirkungskurve des erhöhenden Einflusses von Adenosin und seinen Derivaten auf den cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen zeigt Abb. 8. Neben Adenosin scheinen auch seine Derivate ADP und ATP den cAMP-Spiegel in den Zellen zu erhöhen, während AMP nur einen geringen Effekt aufweist. Die mit den Nukleosidphosphaten gewonnenen Daten sind noch sehr vorläufiger Natur. Insbesondere Versuche mit den stabileren Analoga dieser Verbindungen (z.B. Adenylyl (β, γ -methylen)-diphosphonat, Adenosin-5'-O-thiomonophosphat) müssen noch vorgenommen werden, bevor eine Interpretation der Ergebnisse sinnvoll erscheint.

Die Größe des steigernden Adenosin-Effektes auf den cAMP-Gehalt der Zelle schwankt stark von Versuch zu Versuch. Abb. 8 ist ein Beispiel für die nach 24 Tagen Kulturdauer am häufigsten gefundene Maximal-Stimulation von etwa dem dreifachen des Kontrollwertes (5 Versuche). Bei zwei Versuchen mit jungen Kulturen (13 Tage in Kultur) wurden wesentlich höhere Stimulationen gefunden (bis zum 15-fachen des Kontrollwertes, vgl. Tab. 10, Exp. 1). Die naheliegende Vermutung, daß die Größe des Adenosin-Effektes von der Kulturdauer abhängt, bedarf experimenteller Überprüfung. In zwei Versuchen nach 24 Tagen Kulturdauer waren die Maximalstimulationen durch Adenosin aus ungeklärter Ursache sehr gering (knappe Verdoppelung des Kontrollwertes) und, bei hohen Standardabweichungen, an der Signifikanzgrenze. Tab. 8 gibt ein Beispiel eines solchen Versuches und zeigt gleichzeitig, daß in Anwesenheit von 100 μ M Dipyridamol, einem Hemmstoff der Aufnahme des Adenosins in die Zellen

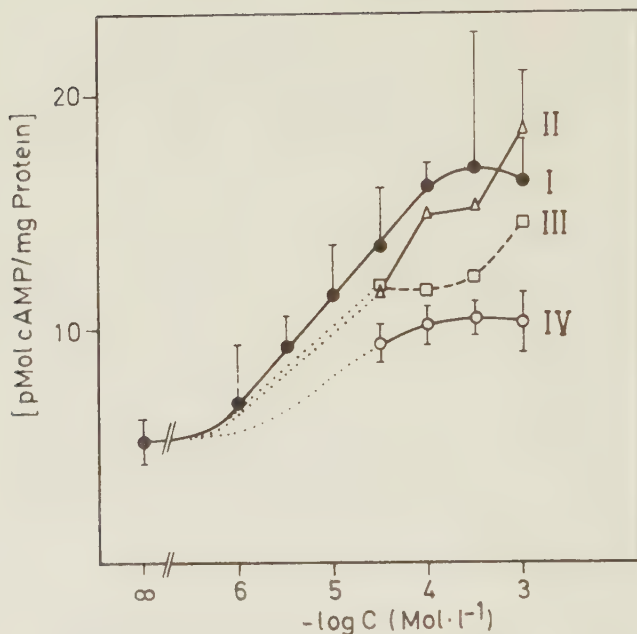


Abb. 8 Effekte von Adenosin (Kurve I), ADP (Kurve II), ATP (Kurve III) und AMP (Kurve IV) auf den cAMP-Spiegel in nicht-neuronalen Hirnzellen. Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 23 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

(29, 212, 225), auch in diesen Fällen eine signifikante Steigerung des cAMP-Spiegels durch Adenosin festzustellen ist.

Der ausgeprägte Effekt von Dipyridamol läßt vermuten, daß seine Wirkung nicht nur auf der Hemmung der Adenosinaufnahme beruht, die zudem bei hohen Adenosin-Konzentrationen kaum noch in Erscheinung tritt (212). Tatsächlich steigert

Tab. 8 Einfluß von Dipyridamol auf die Erhöhung der cAMP-Spiegel durch Adenosin. Primärkulturen nicht-neuro-naler Hirnzellen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 24 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)	
	ohne Dipyridamol	mit Dipyridamol (0.1 mM)
H ₂ O	11 [±] 1	11 [±] 2
Adenosin (10)	9 [±] 1	25 [±] 4
(500)	19 [±] 9	61 [±] 2
(1000)	11 [±] 2	46 [±] 15

Dipyridamol auch den Effekt von NA und Iprot in Abwesenheit, nicht aber in Anwesenheit des Phosphodiesterase-Hemmers MIBX (Tab. 9). Dies läßt vermuten, daß Dipyridamol auch Phosphodiesterase inhibierende Wirkung hat. Ähnliches wird auch von anderen Autoren diskutiert (212, 217, 221, 222). Der Einsatz des üblichen Phosphodiesterase-Inhibitors MIBX zur Verbesserung der quantitativen Reproduzierbarkeit der stimulierenden Adenosin-Effekte scheitert daran, daß der Adenosin-Effekt durch Methylxanthine gehemmt wird (29, 211, 216, 219, 220, 225, 226). Dies ist auch bei den Primärkulturen der Fall. Sowohl MIBX (Tab. 10) als auch Theophyllin (Abb. 9) hemmen die stimulierende Wirkung von Adenosin auf die cAMP-Akkumulation der Zellen. Die Erhöhung des Basiswertes unstimulierter Zellen durch Theophyllin beruht auf der Hemmung der Phosphodiesterase auch durch dieses Methylxanthin (227). Die α -adrenergen bzw. β -adrenergen Antagonisten Phentolamin und Propranolol haben auch in hohen Konzentrationen (100 uM) keinen Einfluß auf den Adenosin-Effekt (Abb. 10).

Tab. 9 Dipyridamol steigert die stimulierende Wirkung von NA und Iprot auf die cAMP-Bildung in Abwesenheit, aber nicht in Anwesenheit von MIBX. Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 26 Tage in Kultur, 0.9 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (μ M)	cAMP (pMol/mg Protein	
	ohne Dipyridamol	mit Dipyridamol (0.1 mM)
Kontrolle	4 $\pm$ 1	17 $\pm$ 6
NA (10)	110 $\pm$ 10	260 $\pm$ 30
Iprot (1)	240 $\pm$ 12	780 $\pm$ 40
MIBX (500)	26 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3
MIBX (500) + NA (10)	1150 $\pm$ 130	1430 $\pm$ 50
MIBX (500) + Iprot (1)	4270 $\pm$ 230	4490 $\pm$ 240

Tab. 10 Erhöhung des cAMP-Spiegels in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen durch Adenosin nach 13 (Exp. 1) und 24 Tagen (Exp. 2) in Kultur. Hemmung des Effektes durch MIBX. 2 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser).

Zusatz (μ M)	Experiment 1	Experiment 2
	cAMP (pMol/mg Protein)	
Kontrolle	6 $\pm$ 0	11 $\pm$ 1
Adenosin (100)	87 $\pm$ 12	20 $\pm$ 1
MIBX (500)	56 $\pm$ 7	69 $\pm$ 5
Adenosin + MIBX	61 $\pm$ 14	61 $\pm$ 9

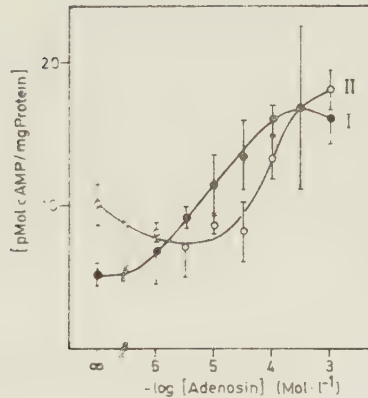


Abb. 9 Die Erhöhung der cAMP-Spiegel in nicht-neuronalen Hirnzellen durch Adenosin (Kurve I) wird durch Theophyllin (0.1 mM) gehemmt (Kurve II). Replika-Kulturen zu denen der Abb. 8

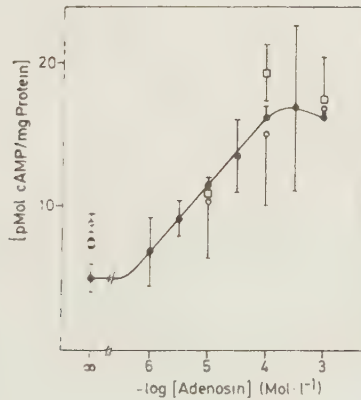


Abb. 10 Die Erhöhung der cAMP-Spiegel in nicht-neuronalen Hirnzellen durch Adenosin (ausgefüllte Kreise) wird weder durch 0.1 mM Propranolol (offene Kreise) noch durch 0.1 mM Phentolamin (offene Quadrate) gehemmt. Replika-Kulturen zu denen der Abb. 8.

Außer dem erhöhenden Einfluß auf die cAMP-Spiegel hat Adenosin auch einen ausgeprägten hemmenden Effekt auf den β -adrenerg gesteuerten cAMP-Gehalt der Kulturen. Die Wirkung von 0.1 μ M Iprot auf den cAMP-Spiegel wird durch Adenosin konzentrationsabhängig unterdrückt (Abb. 11). In Anwesenheit von 0.5 mM MIBX ist dieser Effekt bei 0.1 mM Adenosin fast maximal ausgeprägt (Abb. 11). Die cAMP-steigernde Wirkung dieser Adenosin-Konzentration wird dagegen von 0.5 mM MIBX vollständig verhindert (vgl. Tab. 10).

Dieser Befund ist im Einklang mit den neulich publizierten Ergebnissen anderer Autoren, nach denen die hemmende Wirkung von 0.1 mM Adenosin auf die cAMP-Akkumulation in permeabilisierten Neuroblastomazellen durch 0.1 mM Theophyllin nicht beeinflusst wurde, während die gleiche Inhibitor-Konzentration den cAMP-steigernden Effekt von 0.1 mM Adenosin deutlich absenkte (216).

Obwohl eine Kreuzreaktion am α - oder β -adrenergen Rezeptor wegen der unterschiedlichen chemischen Strukturen von Adenosin und adrenergen Agonisten recht unwahrscheinlich ist, mußte ausgeschlossen werden, daß ein solcher Mechanismus für die inhibitorischen Effekte des Adenosins in Frage kommt. Eine Kompetition am β -Rezeptor sollte sich durch eine Verminderung des Adenosin-Effektes bei Erhöhung der Iprot-Konzentration zu erkennen geben. Einer agonistischen Wirkung des Adenosins am (inhibitorischen α -Rezeptor dagegen sollte durch den α -adrenergen Antagonisten Phentolamin entgegengewirkt werden. Abb. 12 zeigt das Ergebnis eines entsprechenden Experiments. Dosis-Wirkungskurven für Iprot wurden in An- und

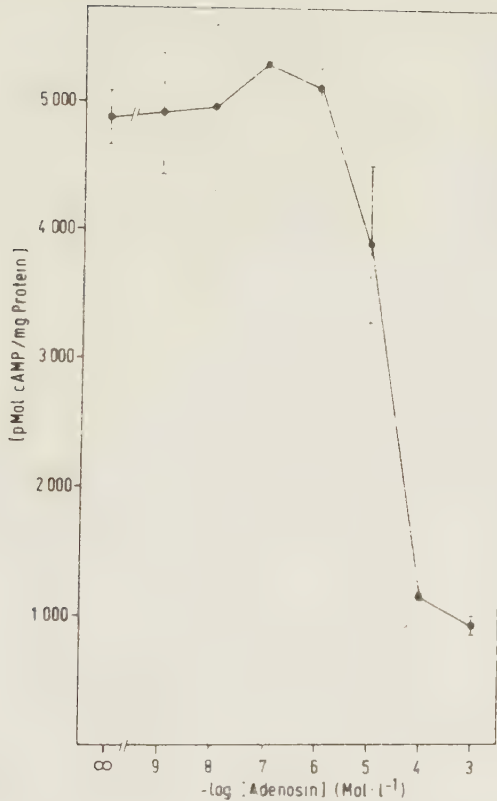


Abb. 11 Hemmung der β -adrenerg (Iprot 0.1 μM) stimulierten cAMP-Bildung durch steigende Konzentrationen von Adenosin in Gegenwart von 0.5 mM MIBX. Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 24 Tage in Kultur. 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Kontrollwerte in Abwesenheit von Iprot (pMol cAMP/mg Protein): H_2O , 11 ± 1 ; Adenosin (0.1 mM), 20 ± 0.5 ; MIBX (0.5 mM), 69 ± 5 ; MIBX (0.5 mM) + Adenosin (0.1 mM), 61 ± 9 .

Abwesenheit von 100 μ M Adenosin und/oder 100 μ M Phentolamin aufgenommen. Der Effekt von Iprot + Phentolamin (100 μ M) (Abb. 12, Kurve I) auf den cAMP-Spiegel wird bei allen Iprot-Konzentrationen durch die Anwesenheit von 100 μ M Adenosin gehemmt (Abb. 12, Kurve III). Erhöhung der Iprot-Konzentration wirkt dem hemmenden Effekt von Adenosin nicht entgegen. Die Gegenwart von Phentolamin (100 μ M) hat keinen Einfluß auf die cAMP-Spiegel in Anwesenheit von Adenosin (100 μ M) und steigender Konzentrationen an Iprot (Abb. 12, Kurven III und IV). Damit kann eine Kreuzreaktion von Adenosin mit dem α - oder dem β -adrenergen Rezeptor ausgeschlossen werden.

Dem inhibitorischen Adenosin-Effekt wird auch in Abwesenheit von Phentolamin durch steigende Iprot-Konzentrationen nicht entgegengewirkt (Abb. 12, Kurven II und IV). Der Effekt wird allerdings geringer, da bei hohen Iprot-Konzentrationen zusätzlich ein α -adrenerger Rezeptor aktiviert wird, dessen inhibitorische Wirkung die Dosis-Wirkungskurve wieder abfallen läßt (Abb. 12, Kurve II, vgl. auch Abschnitt 2.2.2.1 und Abb. 5 und 6). Die inhibitorische Wirkung einer α -adrenergen Reizung und der Hemmeffekt von Adenosin sind offenbar nicht additiv: In Gegenwart von Adenosin wird kein Abfall der Dosis-Wirkungskurve bei hohen Iprot-Konzentrationen beobachtet (Abb. 12, Kurve IV).

Diese Beobachtung wird erhärtet durch die in Tab. 11 aufgeführten Ergebnisse. Der Effekt von NA, das beide adrenerge Rezeptoren aktiviert und daher zu einer vergleichsweise mäßigen Steigerung des cAMP-Spiegels führt (vgl. Abschnitt 2.2.2.1), wird durch Adenosin auf etwa 60% des Kontrollwertes gehemmt. Nach Blockierung des α -Rezeptors mit Phentolamin ist der stimulierende Effekt von Noradrenalin auf mehr als das Doppelte vergrößert (vgl. Abschnitt 2.2.2.1) und die inhibitorische Wirkung von Adenosin wesentlich ausgeprägter (Hemmung auf etwa 35% des Kontrollwertes).

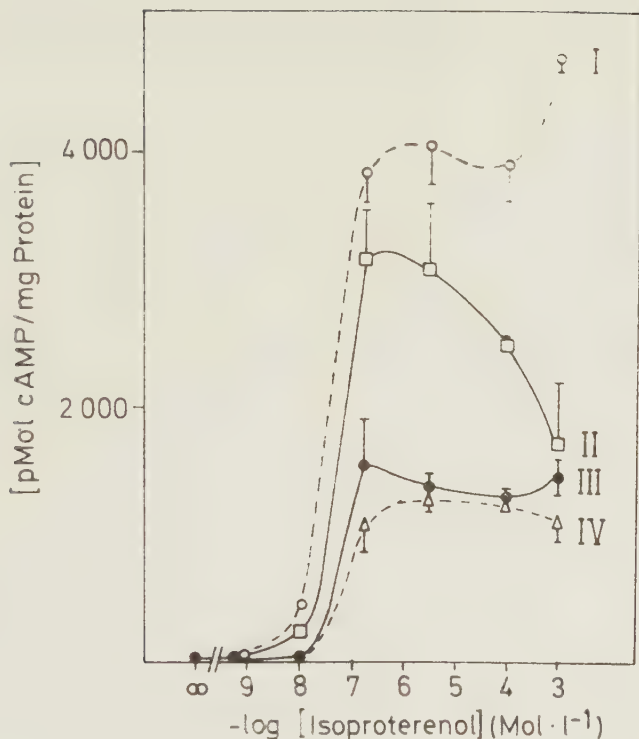


Abb. 12 Dosis-Wirkungskurven für den Effekt von Iprot auf die cAMP-Spiegel in nicht-neuronalen Hirnzellen in Anwesenheit von 0.1 mM Phentolamin (Kurve I), 0.1 mM Phentolamin + 0.1 mM Adenosin (Kurve III), 0.1 mM Adenosin (Kurve IV) bzw. ohne weitere Zusätze (Kurve II). Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 22 Tage in Kultur. 0.8 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX. Kontrollwerte (cAMP/mg Protein): MIBX (0.5 mM), 25 ± 7 ; MIBX + Phentolamin (0.1 mM), 21 ± 5 ; MIBX + Adenosin (0.1 mM), 28 ± 2 ; MIBX + Phentolamin + Adenosin, 27 ± 5 .

Tab. 11 Der inhibitorische Effekt α -adrenerger Stimulierung und der Hemmeffekt von Adenosin sind nicht additiv. Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen, 24 Tage in Kultur. 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (μ M)	cAMP (pMol/mg Protein)
MIBX (500) + NA (10)	1600 $\pm$ 60
MIBX + NA + Adenosin (100):	960 $\pm$ 20
MIBX + NA + Phentolamin (10):	4070 $\pm$ 520
MIBX + NA + Phentolamin + Adenosin:	1500 $\pm$ 200
Kontrollen:	
MIBX (500):	64 $\pm$ 13
MIBX + Adenosin (100):	58 $\pm$ 8
MIBX + Phentolamin (10):	47 $\pm$ 2
MIBX + Adenosin (100) + Phentolamin (10):	48 $\pm$ 9

Auf die Basis-Werte von cAMP in Gegenwart von MIBX (Inhibition der Phosphodiesterase, Inhibition des cAMP-steigernden Adenosin-Effektes) haben weder Adenosin noch Adenosin + Phentolamin einen signifikanten Einfluß. Die in diesem Versuch beobachtete leichte Hemmung des Basiswertes durch Phentolamin ist an der Signifikanzgrenze und wird in anderen Versuchen nicht gefunden (vgl. z.B. Tab. 6, Exp. 1 und Tab. 13).

Die Beobachtung, daß der Hemmeffekt von Adenosin und die inhibitorische Wirkung einer α -adrenergen Reizung nicht additiv sind, läßt zwei Interpretationen zu:

- 1) Die gegen den inhibitorischen Einfluß von Adenosin sensiblen Zellen sind, wenigstens zum Teil, identisch mit denen, die einen α -Rezeptor ausprägen. Die cAMP-Akkumulation kann nicht über ein bestimmtes Maß hinaus gehemmt werden.
- 2) Aktivierung der α -Rezeptoren eines Zelltyps beeinflusst indirekt (etwa durch Ausschüttung eines Faktors) die Sensitivität eines anderen Zelltyps für den Hemmeffekt von Adenosin (auch der umgekehrte Fall ist denkbar: Adenosin beeinflusst indirekt die Sensitivität gegenüber α -adrenerger Inhibition).

Die zweite Erklärungsmöglichkeit erfordert eine Reihe von Zusatzannahmen, für deren Berechtigung bislang keine Hinweise vorliegen. Sie ist aus den in Abschnitt 2.2.4 ausführlich diskutierten Gründen wenig wahrscheinlich.

Vorläufige Ergebnisse aus Untersuchungen des hemmenden Adenosin-Effektes in Abwesenheit von MIBX scheinen zu zeigen, daß Adenosin unter diesen Bedingungen die β -adrenerg vermittelte Erhöhung des cAMP-Gehaltes der Kulturen praktisch vollständig verhindert. In Abb. 13 werden die in Gegenwart von Theophyllin bzw. MIBX erzielten Hemmeffekte von Adenosin mit den in Abwesenheit dieser Agentien beobachteten verglichen. Da beide Drogen in unterschiedlichem Maße auch den Abbau von cAMP hemmen (183, 184, 227), weisen die Kontrollwerte (Iprot-stimulierte cAMP-Bildung in Abwesenheit von Adenosin) Unterschiede bis zu einer Größenordnung auf (siehe Legende der Abb. 13). Daher ist zur besseren Vergleichbarkeit der Werte die erhaltene Inhibition in Prozent angegeben ($\frac{\text{Kontrollwert-inhibierter Wert}}{\text{Kontrollwert}} \times 100$).

Die β -adrenerg (Iprot 0.1 μM) stimulierte cAMP-Bildung in den Kulturen wird in Abwesenheit von Theophyllin oder MIBX durch Adenosin praktisch vollständig gehemmt. Bei einer Konzentration von 1 μM Adenosin ist dieser Effekt schon fast maximal ausgeprägt (Abb. 13, Kurve I).

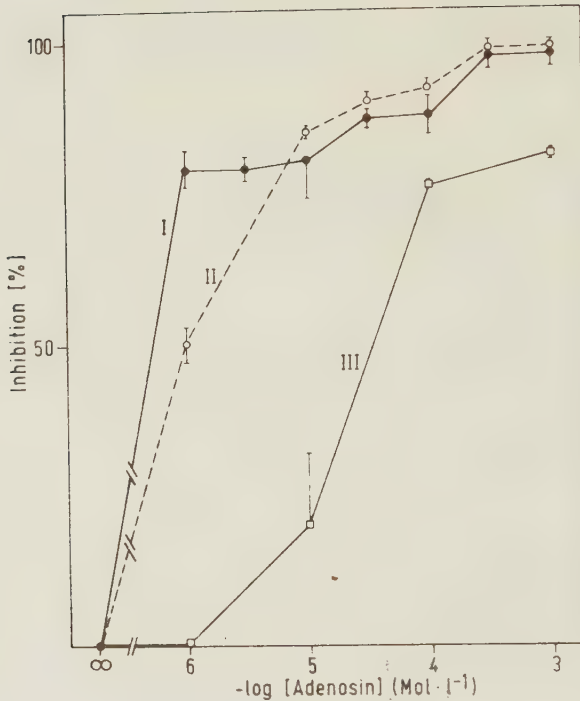


Abb. 13 Hemmung der β -adrenerg (0.1 μ M Iprot) stimulierten cAMP-Akkumulation durch Adenosin ohne weitere Zusätze (Kurve I), in Gegenwart von 0.1 mM Theophyllin (Kurve II) und in Gegenwart von 0.5 mM MIBX (Kurve III). "Stimulierte" Werte in Abwesenheit von Adenosin (pMol cAMP/mg Protein): Iprot (0.1 μ M), 234 ± 21 ; Iprot (0.1 μ M) + Theophyllin (0.1 mM), 454 ± 94 ; Iprot (0.1 μ M) + MIBX (0.5 mM), 4861 ± 221 . Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 24 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Theophyllin (100 μ M) scheint den Effekt von 1 μ M Adenosin zu hemmen, bei höheren Adenosin-Konzentrationen verlaufen die Inhibitionskurven jedoch nahezu deckungsgleich (Abb. 13, Kurve II). MIBX (500 μ M) verhindert die Wirkung niedriger Adenosin-Konzentrationen vollständig und unterdrückt auch den Effekt höherer Konzentrationen teilweise (Abb. 13, Kurve III).

Weitere Untersuchungen (insbesondere bei niedrigeren Adenosin-Konzentrationen) sind sicherlich erforderlich, um diese Effekte zu erhärten. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß dem Hemmeffekt des Adenosins auf die PGE_1 -stimulierte cAMP-Akkumulation in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen nach vorläufigen Ergebnissen ebenfalls durch MIBX entgegengewirkt wird (228).

2'-Desoxyadenosin, das als spezifischer Inhibitor der Adenosin-Wirkung angesehen wird (219, 229), hemmt nicht nur den steigernden Effekt von Adenosin auf die cAMP-Spiegel, sondern auch die durch Iprot stimulierte cAMP-Akkumulation (Tab. 12). Auch eine geringe stimulierende Wirkung ist bei hohen Konzentrationen festzustellen. Eine derart ausgeprägte inhibitorische Wirkung von 2'-Desoxyadenosin auf β -adrenerg gesteierte cAMP-Spiegel wurde zuerst in Fettzellen beobachtet (221, 222). Daß ein solcher Effekt nun auch an Hirnzellen gezeigt werden konnte, berechtigt zu Zweifeln an der Aussagekraft von Ergebnissen, die unter der Voraussetzung einer "spezifischen" Hemmwirkung dieser Substanz auf die Adenosineffekte an Hirnschnitten gewonnen wurden (230).

Die steigernde Wirkung von Adenosin und seinen Derivaten auf den cAMP-Spiegel in Primärkulturen ähnelt in ihrer Hemmbarkeit durch Methylxanthine und 2'-Desoxyadenosin sowie der Potenzierung durch Dipyridamol den auch in anderen Systemen gefundenen Adenosin-Effekten (208-220, 225, 226).

Tab. 12 2'-Desoxyadenosin hemmt die Stimulation der cAMP-Bildung durch Iprot und Adenosin in Primörkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen. 26 Tage Kulturdauer, 0.9 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)	
	ohne 2'-Desoxyadenosin	mit 2'-Desoxyadenosin (0.5 mM)
Kontrolle	4 [±] 1	8 [±] 3
Adenosin (100)	27 [±] 8	15 [±] 4
Iprot (1)	240 [±] 12	42 [±] 7
MIBX (500)	26 [±] 4	30 [±] 4
MIBX + Iprot	4270 [±] 230	440 [±] 110

Eine Reihe von Arbeiten stützen das Konzept einer Vermittlung dieser Effekte über einen Adenosin-Rezeptor (29, 212, 220, 231). Dagegen lassen die bisher vorliegenden Daten noch keine schlüssige Interpretation der inhibitorischen Adenosin-Effekte zu. Zwei Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an:

- 1) Die Existenz eines zweiten, bisher unbekannten Adenosin-Rezeptors, dessen Aktivierung in Analogie zum α -adrenergen Rezeptor zu einer Hemmung der Adenylatcyclase führen würde;
- 2) intrazelluläre Wirkungen des Adenosins, z.B. Stimulierung der Phosphodiesterase oder Hemmung der katalytischen Unter-einheit der Adenylatcyclase (212).

Die Lösung dieses Problems wird erschwert durch die Tatsache, daß eine Reihe von Substanzen, die zum Studium der Adenosin-Effekte verwendet worden sind, an verschiedenen Stellen in den cAMP-Metabolismus eingreifen können und die genaue Wirkungsweise dieser Stoffe noch strittig ist.

So haben die häufig verwendeten Methylxanthine sowohl hemmende Effekte auf die Phosphodiesterase (183, 184, 227) als auch auf die Adenosin-Wirkung. Die häufig behauptete kompetitive Hemmwirkung dieser Stoffe auf den Adenosin-Rezeptor (29, 211, 226, 220) ist umstritten (225). Dipyridamol scheint sowohl ein Hemmstoff der Adenosin-Aufnahme in die Zellen als auch ein Phosphodiesterase-Inhibitor zu sein (212, 217, 221, 222). 2'-Desoxyadenosin ist nach Ergebnissen dieser Arbeit und denen anderer Autoren (208, 221, 222, 225, 226) eher ein inhibitorischer Agonist als ein spezifischer Adenosin-Antagonist.

Die Tatsache, daß sowohl der stimulierende als auch der inhibierende Adenosin-Effekt auch in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen gefunden wird (228), könnte die Untersuchung beider Effekte und ihrer möglichen gegenseitigen Beeinflussung an einem einfachen Modellsystem ermöglichen. An Hirnschnitten wird ein bislang noch völlig unverstandener synergistischer Effekt des Adenosins auf die Wirkungen von biogenen Aminen, Glutamat, Aspartat und depolarisierenden Konzentrationen von K^+ -Ionen gefunden (197). Da Gliazellen etwa 90% der Zellzahl des Gehirns ausmachen, haben sie möglicherweise einen wesentlichen Anteil an diesen Effekten. Eine weitere Untersuchung der Adenosin-Wirkung auf die hier beschriebenen Kulturen nicht-neuronaler Hirnzellen könnte daher zur Klärung dieser Phänomene beitragen.

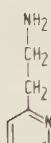
2.2.2.7 Histamin

Die verschiedenen physiologischen Effekte von Histamin können in zwei Klassen eingeteilt werden (232, 233): Während etwa die histamin-induzierte Kontraktion glatter Muskulatur durch die klassischen Antihistaminika (z.B. Pyrilamin) gehemmt wird, haben diese Drogen auf andere periphere Histamin-Effekte, wie etwa die Stimulierung der Magensäure-Sekretion und die Hemmung der Unteruskontraktion, keinen Einfluß. Diese Effekte können aber durch die neu entwickelten Antagonisten Burimamid und Metiamid (233, 234) gehemmt werden. Den ersten Typ der Histamin-Wirkungen denkt man sich über eine Klasse von Rezeptoren vermittelt, die als "H1-Rezeptoren" bezeichnet werden, den zweiten Wirkungstyp entsprechend über "H2-Rezeptoren". Abb. 14 zeigt einige H1- und H2-Agonisten und Antagonisten.

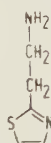
Eine Reihe von elektrophysiologischen (235-239) und neurochemischen (240, 241) Resultaten deutet auf eine Neurotransmitter-Funktion von Histamin hin. Sowohl in peripheren Systemen als auch in Hirnpräparaten wird eine erhöhte cAMP-Bildung in Gegenwart von Histamin beobachtet (242-252). Histamin bewirkt auch eine Erhöhung der cAMP-Spiegel in menschlichen Astrocytomazellen (28). Dagegen wurde in Primärkulturen foetaler Ratten (142) kein solcher Effekt festgestellt, obwohl solche Kulturen einen sehr hohen Anteil an mutmaßlichen Glia-Vorläufer-Zellen aufweisen (111).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Histamin in Abwesenheit eines Phosphodiesterase-Hemmstoffs den cAMP-Gehalt der Kulturen geringfügig steigert. Die Signifikanz des Effektes ist jedoch fraglich (Legende der Abb. 15). In Gegenwart von 0.5 mM MIBX steigert Histamin den cAMP-Gehalt dagegen auf etwa das 2-3fache des Kontrollwertes bei maximal wirksamer Konzentration (Abb. 15, Kurve I). Gelegentlich wurden auch größere Effekte beobachtet (vgl. z.B. Tab. 14).

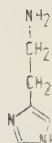
H1-Rezeptor



I

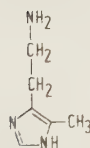


II

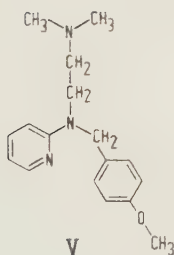


III

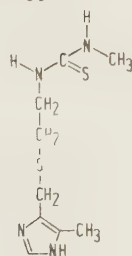
H2-Rezeptor



IV



V



VI

Abb. 14 Histamin-Agonisten (I - IV) und Antagonisten (V und VI); I: 2-(2-Aminoäthyl)pyridin; II: 2-(2-Aminoäthyl)thiazol; III: Histamin; IV: 4-Methylhistamin; V: Pyrilamin; VI: Metiamid.

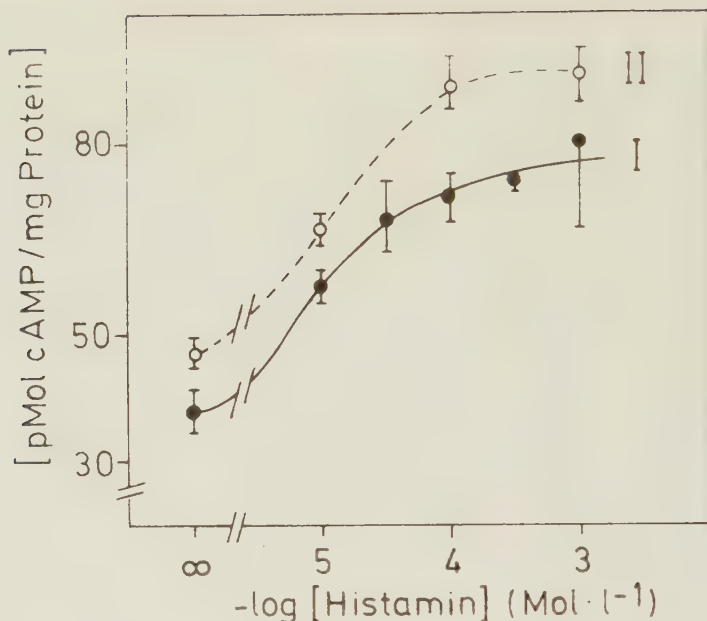


Abb. 15 Histamin erhöht den intrazellulären cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen (Kurve I). Der Effekt wird durch 0.1 mM Propranolol (Kurve II) nicht gehemmt. Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 23 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Alle Inkubationen erfolgten in Gegenwart von 0.5 mM MIBX. In Abwesenheit von MIBX ist der Histamin-Effekt an der Signifikanzgrenze, wie in einem weiteren Versuch gezeigt wurde: H₂O-Kontrolle: 4.3 ± 1.2 pMol cAMP/mg Protein; Histamin (200 μ M): 6.9 ± 1.2 , MIBX (500 μ M): 25 ± 4 , MIBX + Histamin: 58 ± 4 (Primärkulturen 26 Tage in Kultur, 0.9 mg Protein pro Platte).

Der Effekt wird durch den β -adrenergen Antagonisten Propranolol nicht gehemmt (Abb. 15, Kurve II). Damit ist eine Kreuzreaktion mit dem β -adrenergen Rezeptor ausgeschlossen. Die bei den verwendeten hohen Konzentrationen beobachtbare agonistische Eigen-

wirkung von Propranolol auf den β -Rezeptor ist auch bei hohen Histamin-Konzentrationen noch additiv zum Histamin-Effekt (Abb. 15, Kurve II), ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung zweier verschiedener Rezeptoren. Da auch der α -adrenerge Antagonist Phentolamin keinen Einfluß hat (Tab. 13) und der stimulatorische Adenosin-Rezeptor ohnehin durch die Gegenwart von 0.5 mM MIBX blockiert ist (vgl. Abschnitt 2.2.2.2, Tab. 10), kann keiner der an den Kulturen bislang festgestellten Rezeptoren für den Effekt von Histamin verantwortlich sein. Damit ist die Anwesenheit eines echten Histamin-Rezeptors anzunehmen.

Tab. 13 Phentolamin hat keinen Einfluß auf die Steigerung der cAMP-Spiegel durch Histamin. Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen, 22 Tage in Kultur, 0.8 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)
MIBX (500)	25 [±] 7
MIBX + Histamin (100)	58 [±] 7
MIBX + Phentolamin (100)	21 [±] 3
MIBX + Phentolamin + Histamin	55 [±] 11

Hemmstudien mit dem H1-Antagonisten Pyrilamin und dem H2-Antagonisten Metiamid sollten Aufschluß über den Typ des beteiligten Histamin-Rezeptors geben. Die Steigerung der cAMP-Spiegel durch Histamin (Abb. 16, Kurve III) wird durch 10 uM Pyrilamin (Abb. 16, Kurve IV) gehemmt. In Gegenwart von 100 uM Pyrilamin ist auch der Effekt hoher Histamin-Konzentrationen nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 16, Kurve V).

Allerdings hat Pyrilamin auch eine ausgeprägte absenkende Eigenwirkung auf die Basis-Werte in Abwesenheit von Histamin.

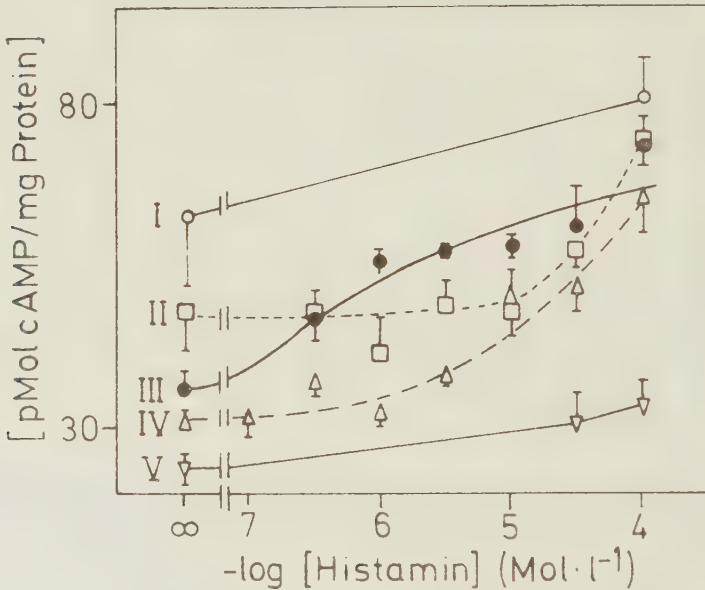


Abb. 16 Einfluß von Histamin-Antagonisten auf die Steigerung der cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen durch Histamin. (Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX) Kurve I: Histamin + Metiamid (0.1 mM), Kurve II: Histamin + Metiamid (0.01 mM), Kurve III: Histamin ohne weitere Zusätze, Kurve IV: Histamin + Pyrilamin (0.01 mM), Kurve V: Histamin + Pyrilamin (0.1 mM). Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse, 17 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Auch Metiamid hat eine deutliche, konzentrationsabhängige Eigenwirkung (Abb. 16, Kurven I und II), die aber, im Gegensatz zu Pyrilamin, zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels führt.

Die Stimulierung der cAMP-Akkumulation durch Histamin (Abb. 16, Kurve III), wird auch durch Metiamid (10 μ M) gehemmt (Abb. 16, Kurve II). Die Eigenwirkung von 100 μ M Metiamid (Abb. 16, Kurve I) ist nahezu gleichgroß wie der maximale Histamin-Effekt und nicht additiv zu diesem. Dies könnte darauf hinweisen, daß in diesem System der Antagonist auch agonistische Wirkung am gleichen Histamin-Rezeptor aufweist, also ein gemischter Agonist/Antagonist ist. Eine ähnlich hohe, stimulatorische Eigenwirkung eines H₂-Antagonisten auf die Adenylatcyclase ist auch für das obere Zervikal-Ganglion berichtet worden (248).

Wegen der hohen Eigenwirkungen von Pyrilamin und Metiamid schien es erforderlich, die Spezifität beider Histamin-Antagonisten in den verwendeten Kulturen zu überprüfen. Tab. 14 zeigt die Effekte mäßiger Konzentrationen (10 μ M) beider Agentien auf die durch Histamin (100 μ M) bzw. Iprot (0.1 μ M) stimulierte cAMP-Akkumulation. Beide Histamin-Antagonisten hemmen den Histamin-Effekt, während nur Pyrilamin einen signifikanten Einfluß auf den Iprot-Effekt hat (ca. 50% Hemmung). Damit kann die Hemmung des Histamin-Effektes durch den H₁-Antagonisten Pyrilamin nicht als Hinweis auf das Vorliegen eines H₁-Rezeptors gewertet werden.

Die spezifischen H₁-Agonisten 2-(2-Aminoäthyl)thiazol und 2-(2-Aminoäthyl)pyridin (253) hatten in einem Versuch bei niedrigen Konzentrationen einen leicht absenkenden Effekt auf den cAMP-Spiegel der Kulturen, der bei höheren Konzentrationen wieder abnimmt (Abb. 17, Kurven II und III). Ein Wiederholungsversuch bestätigte, daß 2-(2-Aminoäthyl)pyridin (10 μ M, 1000 μ M) den cAMP-Spiegel nicht steigert (Daten nicht gezeigt). Damit ist die Vermittlung des stimulierenden Histamin-Effektes über einen H₁-Rezeptor sehr unwahrscheinlich.

Tab. 14 Untersuchungen zur Spezifität der Histamin-Antagonisten Pyrilamin und Metiamid in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen. 15 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)
MIBX (500)	51 [±] 8
MIBX + Pyrilamin (10)	37 [±] 14
MIBX + Metiamid (10)	71 [±] 31
MIBX + Histamin (100)	220 [±] 60
MIBX + Histamin + Pyrilamin	40 [±] 8
MIBX + Histamin + Metiamid	72 [±] 4
MIBX + Iprot (0.1)	3380 [±] 350
MIBX + Iprot + Pyrilamin	1790 [±] 490
MIBX + Iprot + Metiamid	2720 [±] 340

Die steigernde Wirkung des Histamins auf den cAMP-Gehalt in Primärkulturen ist daher vermutlich auf die Aktivierung eines H₂-Rezeptors zurückzuführen. Eine Klärung wird erst durch eine Untersuchung der Wirkung spezifischer H₂-Agonisten, wie etwa 4-Methylhistamin (233), möglich sein, die uns während der Durchführung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung standen.

Auch in allen übrigen untersuchten Systemen einschließlich Hirnhomogenaten waren H₂-Rezeptoren für die Steigerung des cAMP-Spiegels durch Histamin verantwortlich (245, 246, 249-252). Eine Ausnahme bilden Hirnschnitte, bei denen sowohl

H1- als auch H2-Rezeptoren an der Erhöhung der cAMP-Spiegel beteiligt sein sollen (197, 242-244). In diesem System muß allerdings mit indirekten Effekten über intakte synaptische Verknüpfungen gerechnet werden.

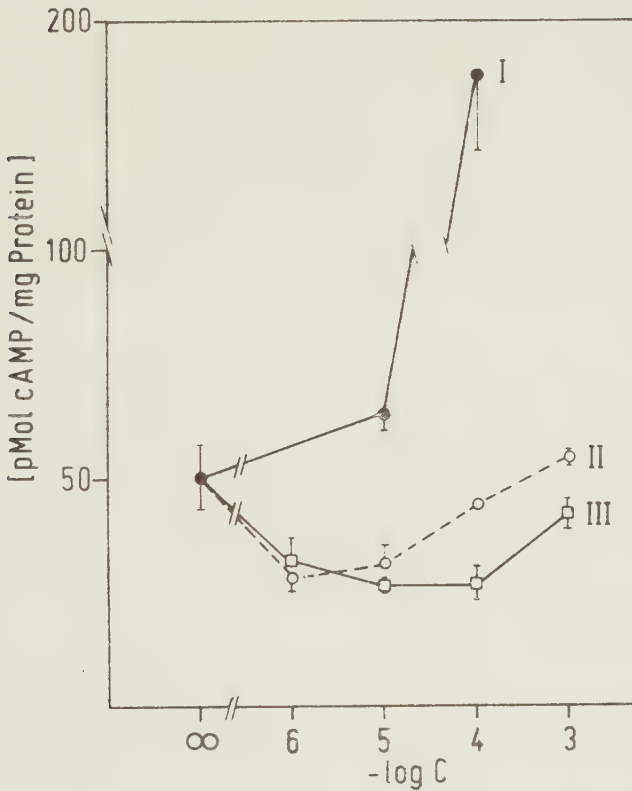


Abb. 17 Wirkung steigender Konzentrationen von Histamin (Kurve I) und der H1-Agonisten 2-(2-Aminoäthyl)thiazol (Kurve II) und 2-(2-Aminoäthyl)pyridin (Kurve III) auf die intrazellulären cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen, 24 Tage in Kultur, 0.9 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Alle Inkubationen erfolgten in Gegenwart von 0.5 mM MIBX.

Die hemmende Eigenwirkung des H1-Antagonisten Pyrilamin ist besonders interessant, da auch die spezifischen H1-Agonisten 2-(2-Aminoäthyl)thiazol und 2-(2-Aminoäthyl)pyridin die Erhöhung der cAMP-Spiegel durch Iprot hemmen (Tab. 15). Auch Histamin hat einen inhibitorischen Einfluß auf die cAMP-Akkumulation. Bei dem in Tab. 15 dargestellten Versuch war dieser Effekt jedoch erst bei 1 mM Histamin zu beobachten. In anderen Versuchen wurde dagegen schon bei geringeren Histamin-Konzentrationen eine deutliche Hemmung beobachtet (vgl. z.B. Tab. 20, Abschnitt 2.2.2.6). Andere Autoren, die eine analoge Wirkung von Histamin an Hirnschnitten beobachteten (244), wiesen auf eine mögliche Aktivierung von Phosphodiesterasen durch Imidazolderivate (254) hin. Weitere Untersuchungen werden zu klären haben, ob ein solcher Mechanismus für die beobachtete Absenkung der cAMP-Spiegel verantwortlich sein kann.

Tab. 15 Einfluß von Histamin und spezifischen H1-Rezeptor-Agonisten auf die β -adrenerg stimulierte cAMP-Akkumulation in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen. 24 Tage in Kultur, 0.9 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Alle Inkubationen wurden in Gegenwart von MIBX (0.5 mM) durchgeführt. cAMP-Gehalt in Anwesenheit von MIBX ohne weitere Zusätze: 50 ± 6.9 pMol/mg Protein.

Zusatz (μ M)	cAMP (pMol/mg Protein)
Iprot (0.1)	2950 ± 190
Iprot + Histamin (100)	2740 ± 40
Iprot + Histamin (1000)	1580 ± 480
Iprot + 2-(2-Aminoäthyl)thiazol (10)	2540 ± 190
Iprot + 2-(2-Aminoäthyl)thiazol (100)	2080 ± 170
Iprot + 2-(2-Aminoäthyl)pyridin (10)	2300 ± 240
Iprot + 2-(2-Aminoäthyl)pyridin (100)	1800 ± 230

Eine interessante Alternative wäre die Vermittlung des inhibitorischen Effektes über einen H1-Rezeptor, da in diesem Fall eine direkte Analogie zu den stimulierenden β -adrenergen und inhibierenden α -adrenergen Effekten gegeben wäre. In einer Reihe von Geweben sind die über H1-Rezeptoren vermittelten physiologischen Effekte von Histamin gegenläufig zu den über H2-Rezeptoren vermittelten (235, 251, 255). Die Hypothese einer inhibitorischen Wirkung einer H1-Aktivierung auf den cAMP-Spiegel ist daher attraktiv. Die Hemmeffekte von Histamin und H1-Agonisten sind allerdings reproduzierbar nur bei vergleichsweise hohen Konzentrationen zu beobachten. Daher ist bislang keine klare Evidenz für einen inhibitorischen H1-Effekt gegeben.

2.2.2.4 Prostaglandine

Als Prostaglandine bezeichnet man eine Reihe von Derivaten ungesättigter Fettsäuren, die 20 C-Atome sowie einen Cyclopentanring als gemeinsame Strukturelemente aufweisen. Sie finden sich in allen Geweben von Säugetieren, wo sie eine Fülle von hormonähnlichen Effekten haben. In Ermangelung eines Verständnisses ihrer biologischen Funktion wird ihnen die Rolle eines "Modulators der Hormonwirkung" zugeschrieben. Im Nervensystem wie in anderen Geweben beeinflussen sie die Spiegel von cyclischen Nukleotiden (165).

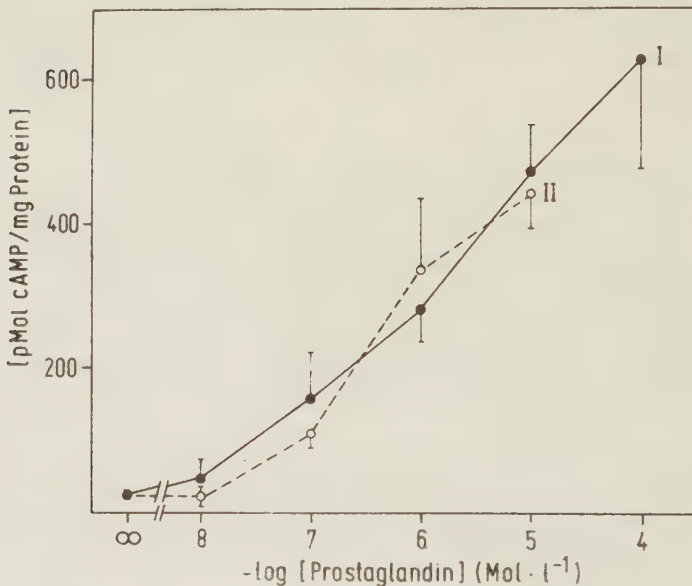


Abb. 18 Dosis-Wirkungskurven für den Effekt von PGE₁ (Kurve I) und PGE₂ (Kurve II) auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen, 16 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX.

Sowohl PGE_1 als auch PGE_2 erhöhen den cAMP-Spiegel in Primärkulturen des Gehirns perinataler Mäuse. Abb. 18 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für beide Prostaglandine. Auffällig ist, daß PGE_1 und PGE_2 erst bei Konzentrationen wirksam sind, die weit über dem in anderen Systemen gefundenen Konzentrationsbereich liegen, sowie der deckungsgleiche Verlauf der Dosis-Wirkungskurven beider Prostaglandine. Selbst bei Konzentrationen von 0.1 mM bzw. 0.01 mM ist noch keine Sättigung erreicht. Dies könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, daß eine Kreuzreaktion mit einem Rezeptor für ein anderes Prostaglandin gemessen wird und/oder die Prostaglandine in Analogie zu NA, Adenosin und Histamin auch inhibitorische Effekte auf den cAMP-Spiegel der Zellen haben. Signifikante inhibitorische Effekte wurden aber bei einem entsprechenden Versuch nicht beobachtet (Tab. 16). Klarheit kann hier nur die Untersuchung der Effekte weiterer Prostaglandine erbringen.

Tab. 16 Prostaglandin E_1 hat keinen Einfluß auf die β -adrennerg stimulierte cAMP-Akkumulation in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen. Replika-Kulturen zu denen der Abb. 18. Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX.

Zusatz (uM)	cAMP(pMol/mg Protein)
Iprot (0.1)	2560 [±] 94
Iprot+ PGE_1 (0.01)	2290 [±] 230
(0.1)	1970 [±] 490
(1.0)	2320 [±] 170
(10)	2350 [±] 230
(100)	2740 [±] 380

2.2.2.5 Serotonin, Carbamylcholin, Melatonin

Vorläufige Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf einen Effekt von Serotonin, Carbamylcholin oder Melatonin auf die cAMP-Spiegel in Primärkulturen in Gegenwart des Phosphodiesterase-Inhibitors MIBX (0.5 mM) (Tab. 17). Weitere Experimente werden zu klären haben, ob:

- 1) Die Anwesenheit von Adenosin einen Serotonin-Effekt hervorruft, wie dies in Schnitten aus Meerschweinchenhirn der Fall ist (256),
- 2) die Agentien eventuell einen inhibitorischen Effekt auf die β -adrenerg stimulierte cAMP-Akkumulation haben.

Tab. 17 Untersuchungen zur Wirkung von Serotonin, Carbamylcholin und Melatonin auf die cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen aus perinatalen Mäusen, 24 Tage (Exp. 1) bzw. 27 Tage (Exp. 2) in Kultur, 2 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser).

Zusatz (uM)		cAMP (pMol/mg Protein)
Exp. 1	MIBX (500)	46 ⁺ 3
	MIBX + Serotonin (1)	46 ⁺ 2
	MIBX + Serotonin (100)	54 ⁺ 3
Exp. 2	MIBX (500)	49 ⁺ 7
	MIBX + Carbamylcholin (1)	45 ⁺ 3
	MIBX + Carbamylcholin (100)	59 ⁺ 6
	MIBX + Melatonin (1)	64 ⁺ 10

2.2.2.6 Hormon-Kombinationen

α -adrenerge Agonisten, Adenosin und Histamin sowie H₁-Agonisten hemmen die β -adrenerg stimulierte cAMP-Akkumulation in den in dieser Arbeit untersuchten Primärkulturen. Die in gewisser Hinsicht ähnliche Hemmung der PGE₁-stimulierten cAMP-Akkumulation in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen durch Morphin war nicht nur bei den durch PGE₁, sondern auch bei den durch MIBX, Mn²⁺-Ionen und Adenosin erhöhten cAMP-Spiegeln zu beobachten (175).

Ist eine ähnliche universelle inhibitorische Wirkung auch bei den nicht-transformierten Hirnzellen gegeben? Die Untersuchung dieser Frage ist dadurch erschwert, daß NA, Histamin und Adenosin den cAMP-Gehalt der Primärkulturen gleichzeitig auch steigern. Zudem zeigen die Antagonisten der stimulatorischen Histamin- und Adenosin-Effekte ausgeprägte Eigenwirkungen. Daher konnten in dieser Arbeit neben der Hemmung des β -adrenergen Effektes nur die Wirkungen der Agentien auf den Prostaglandin-Effekt mit einiger Verlässlichkeit untersucht werden, da bei der Höhe dieser Stimulation die cAMP-steigernden Wirkungen der Agentien bzw. die Eigenwirkung der Antagonisten nicht mehr stark ins Gewicht fallen.

Die durch PGE₁ ausgelöste Steigerung des cAMP-Gehaltes der Kulturen wird durch den α -adrenergen Agonisten Phenylephrin nicht gehemmt; NA, dessen β -adrenerge Wirkung durch Propranolol geblockt ist, bleibt ebenfalls ohne inhibitorischen Einfluß (Tab. 18). Die inhibitorische Wirkung einer α -Rezeptor-Aktivierung auf die β -adrenerg stimulierte cAMP-Akkumulation ist dagegen aus der Erhöhung der NA-Wirkung durch Phentolamin (Tab. 18 Exp. 1) bzw. der Hemmung des Iprot-Effektes durch NA (Tab. 18 Exp. 2) in Replika-Kulturen klar ersichtlich.

Tab. 18 Die Steigerung der cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen durch PGE_1 wird durch α -Agonisten nicht gehemmt. Primärkulturen 23 Tage (Exp. 1) bzw. 24 Tage (Exp. 2) in Kultur, 2 mg (Exp. 1) bzw. 1 mg (Exp. 2) Protein pro Platte, 85 mm (Exp. 1) bzw. 60 mm (Exp. 2) Durchmesser. Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX. Basis-Werte mit MIBX (pMol cAMP/mg Protein): 36 (Exp. 1) bzw. $26^{\pm} 6$ (Exp. 2).

Zusatz (μM)		cAMP (pMol/mg Protein)
Exp. 1	PGE_1 (0.1)	$180^{\pm} 60$
	PGE_1 +Phenylephrin (1)	$140^{\pm} 10$
	PGE_1 +Propranolol	$220^{\pm} 20$
	PGE_1 +NA (1)	
	+Propranolol (10)	$210^{\pm} 20$
	NA	$1140^{\pm} 40$
	NA	
	+Propranolol	$45^{\pm} 8$
	NA	
	+Phentolamin (10)	$2630^{\pm} 290$
Exp. 2	PGE_1 (10)	$280^{\pm} 30$
	PGE_1 +Propranolol (100)	$440^{\pm} 100$
	PGE_1 +NA (10)	
	+Propranolol	$330^{\pm} 50$
	Iprot (0.1)	$2710^{\pm} 180$
	Iprot + NA	$1520^{\pm} 60$

Tab. 19 Die Steigerung der cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen durch PGE_1 wird durch Adenosin nicht gehemmt. Alle Inkubationen in Gegenwart von 0.5 mM MIBX. Basis-Werte mit MIBX: 54 ± 4 (Exp. 1), 24 ± 1 (Exp. 2). Primärkulturen aus perinatalen Mäusen, 24 Tage in Kultur, 2.6 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser) (Exp. 1) bzw. 16 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser) (Exp. 2).

Zusatz (uM)		cAMP (pMol/mg Protein)
Exp. 1	PGE_1 (0.1)	200 ± 30
	PGE_1 + Adenosin (100)	200 ± 20
Exp. 2	PGE_1 (10)	470 ± 70
	PGE_1 + Adenosin (100)	540 ± 100
	Iprot (0.1)	2040 ± 120
	Iprot + Adenosin	790 ± 60

Auch Adenosin hat keinen Effekt auf die Erhöhung der cAMP-Spiegel durch PGE_1 . Während der Iprot-Effekt durch 100 uM Adenosin auf über die Hälfte abgesenkt wird, bleibt die Stimulierung durch PGE_1 (10 uM) in den gleichen Kulturen uneinflusst (Tab. 19, Exp. 2). Auch die Wirkung einer 100 mal geringeren PGE_1 -Konzentration wird durch Adenosin nicht gehemmt (Tab. 19, Exp. 1).

Histamin ist ebenfalls ohne jede sichtbare inhibitorische Wirkung auf den PGE_1 -Effekt. Tab. 20 zeigt einen Versuch, in dem Histamin in 100 uM Konzentration zwar die β -adrenerg gesteigerten cAMP-Spiegel stark absenkt, aber der Erhöhung

Tab. 20 Die Steigerung der cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen durch PGE_1 wird durch Histamin nicht gehemmt. Primärkulturen 24 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)
MIBX (500)	26 ± 6
MIBX + Histamin (100)	73 ± 3
MIBX + PGE_1 (10)	280 ± 30
MIBX + PGE_1 + Histamin	350 ± 30
MIBX + Iprot (0.1)	2710 ± 170
MIBX + Iprot + Histamin	720 ± 220

des cAMP-Gehaltes durch PGE_1 in Replika-Kulturen nicht entgegenwirkt. Der stimulatorische Histamin-Effekt scheint, im Rahmen der Meßgenauigkeit, additiv zum PGE_1 -Effekt zu sein.

2.2.3 Reproduzierbarkeit der gemessenen Effekte

Eine wesentliche Voraussetzung der Verlässlichkeit von Ergebnissen ist ihre Reproduzierbarkeit. Untersuchungen an primärem, biologischem Material werden von einer Fülle von Parametern beeinflusst, die nicht immer vollständig kontrollierbar sind. Daher sollen hier die Faktoren diskutiert werden, die für die erwähnten Schwankungen der in dieser Arbeit erhaltenen Meßergebnisse verantwortlich sein könnten.

Die aus perinatalem Gehirn gewonnene Zellsuspension besteht zum großen Teil aus prädeterminierten Stammzellen, die unter den Kulturbedingungen differenzierte Funktionen entwickeln (111, 119, 142). Der Grad und eventuell bei pluripotenten Stammzellen, die Richtung der Differenzierung, könnte z.B. beeinflusst werden von:

- 1) Direktem Zell-Zell Kontakt,
- 2) indirekter zellulärer Kommunikation (über ausgeschiedene hormonähnliche Faktoren),
- 3) exogenen hormonellen Faktoren (z.B. aus dem Serum),
- 4) Kontakten zwischen Zellen und Plattenboden,
- 5) Temperatur,
- 6) pH-Wert,
- 7) chemischer Zusammensetzung des Wachstumsmediums (z.B. CO_2 - und O_2 -Gehalt, Glucose-, Aminosäuren-, Vitamin-Konzentration).

Kleine Variationen in den Kulturbedingungen, die derartige Faktoren beeinflussen, könnten, über den Differenzierungsprozeß der Zellen vielfach verstärkt, einen starken Einfluß haben. So könnte zum Beispiel eine Serum-Charge einen bestimmten Faktor nicht enthalten, der für das Überleben und/oder die biochemische Differenzierung einer kleinen Subpopulation von Zellen nötig ist. Diese Subpopulation könnte selbst

zwar in der Messung nicht direkt in Erscheinung treten, aber einen Faktor produzieren, der die Ausprägung einer differenzierten Funktion bei anderen Zellen beeinflusst.

Variationen können daher zum Beispiel hervorgerufen werden durch: Unterschiedliche Chargen von Serum oder Kulturschalen, Unterschiede in CO_2 -Konzentration oder Temperatur bei Verwendung verschiedener Inkubatoren, Fehler bei der Bestimmung der Zelldichte vor dem Ansäen der Kulturen.

Die in dieser Arbeit gemessenen biochemischen Parameter wiesen große Unterschiede im Grad ihrer Reproduzierbarkeit auf: Keine größeren Schwierigkeiten bereitet die Messung der adrenerg vermittelten Effekte. Sie waren qualitativ immer und quantitativ in den angegebenen Grenzen (vgl. Abschnitt 2.2.2.1) gut reproduzierbar. Das gleiche gilt für die Prostaglandin-Effekte. Dagegen weisen die stimulatorischen Adenosin- und Histamin-Effekte eine hohe Variabilität auf: Die Schwankungen in der maximalen Erhöhung des cAMP-Spiegels zwischen verschiedenen Versuchen betragen bis zu einer Größenordnung. Hohe Adenosin-Effekte wurden häufiger an jüngeren Kulturen (13-15 Tage in Kultur) gefunden, während die Variation der Histamin-Effekte keine Altersabhängigkeit erkennen ließ. Der hemmende Effekt des Histamins wurde in manchen Versuchen schon bei geringen ($1 \mu\text{M}$), in anderen erst bei sehr hohen Konzentrationen (1 mM) beobachtet, auch der Maximaleffekt ist sehr unterschiedlich. Dagegen ist der inhibitorische Adenosin-Effekt auch quantitativ gut reproduzierbar.

Während Ratten-Gliomazellen C6 und menschliche Astrocytomazellen Adenylatcyclase gekoppelte β -Rezeptoren und Prostaglandin-Rezeptoren haben, akkumulieren nur die letzteren cAMP nach Stimulierung mit Histamin oder Adenosin (28-30, 32-34). Inzwischen wird der Histamin-Effekt auch

bei Astrocytomazellen nicht mehr beobachtet (257). In Verbindung mit der bei Primärkulturen beobachteten hohen Variationsbreite der Adenosin- und Histamin-Effekte könnte dies daraufhindeuten, daß in Glia-Stammzellen zur Ausprägung von adenylatcyclase-regulierenden Adenosin- und Histamin-Rezeptoren zusätzliche differenzierende Stimuli erforderlich sind.

2.2.4 Die Zuordnung eines Satzes von differenzierten Eigenschaften: Eine Möglichkeit zur Identitätsmarkierung von Zellen in gemischten Kulturen begrenzter Heterogenität?

Die Anreicherung eines bestimmten Zelltyps erfordert einen Satz von zell-spezifischen "Markern", der es erlaubt, die Identität und unveränderte funktionelle Intaktheit des gewünschten Zelltyps während der Anreicherungsprozedur zu kontrollieren. Als derartige "Marker" können bei Gliazellen zum Beispiel die Induzierbarkeit der Glycerinphosphat-Dehydrogenase oder der Gehalt an "GFA"-Protein dienen (vgl. Einleitung).

Die in dieser Arbeit festgestellte Tatsache, daß von den vier Agentien (NA, Histamin, Adenosin, Prostaglandin), die den cAMP-Spiegel in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen erhöhen, drei (NA, Histamin, Adenosin) auch einen inhibitorischen Effekt auf die stimulierte cAMP-Akkumulation ausüben, könnte die Möglichkeit bieten, einem Zelltyp auch in gemischten Zellpopulationen einen Satz von Eigenschaften zuzuordnen. Voraussetzung dafür ist allerdings die Richtigkeit der folgenden Annahme: Wenn in einer gemischten Kultur Effekte eines Agens A von einem Agens B inhibiert werden, so muß wenigstens ein Teil der Zellen von beiden Agentien direkt beeinflusst werden.

Es muß also ausgeschlossen werden, daß die Wirkung eines der Agentien indirekt vermittelt wird (etwa durch die Stimulation eines Zelltyps zur Ausschüttung eines Faktors, der den Effekt an anderen Zellen hervorruft). Indirekte Vermittlung von Effekten ist sicher zu berücksichtigen in Systemen mit intakter histotypischer Organisation sowie funktionsfähigen synaptischen Verknüpfungen. In den in dieser Arbeit beschriebenen Primärkulturen ist dagegen die indirekte Vermittlung der inhibitorischen Effekte auf die Akkumulation von cAMP aus

folgenden Gründen sehr unwahrscheinlich:

- 1) Da die Kulturen aus nicht-neuronalen Zellen bestehen, können synaptische Verknüpfungen ausgeschlossen werden.
- 2) Histotypische Organisation ist in Oberflächenkulturen aus dissoziierten Einzelzellen nicht zu beobachten.
- 3) Analoge, inhibitorische Effekte werden auch in homogenen Kulturen permanenter Zell-Linien (24, 25) sowie in zellfreien Systemen (186, 224, 258) beobachtet.

Die Richtigkeit der oben gemachten Annahme ist also für die hier beschriebenen Kulturen zumindest eine sinnvolle Arbeitshypothese.

Unter dieser Voraussetzung können in den beschriebenen Kulturen folgende Eigenschaftskombinationen jeweils einem Zelltyp zugeordnet werden:

- 1) β -Rezeptor (cAMP-Gehalt steigernd, "stimulatorisch")
+ α -Rezeptor (cAMP-Akkumulation hemmend, "inhibitorisch");
- 2) β -Rezeptor (stim.)
+ Histamin-Effekt (inhib., H1-Rezeptor?);
- 3) β -Rezeptor (stim.)
+ Adenosin-Effekt (inhib., Rezeptor?).

Prinzipiell müßten auch meßbar sein:

Histamin (stim.) + α -Agonist (inhib.),
Histamin (stim.) + Adenosin (inhib.),
Histamin (stim.) + Histamin (inhib.),
Adenosin (stim.) + α -Agonist (inhib.),
Adenosin (stim.) + Adenosin (inhib.),
Adenosin (stim.) + Histamin (inhib.).

Diese Kombinationen konnten in dieser Arbeit noch nicht untersucht werden, da bei den geringen agonistischen Effekten von Histamin und Adenosin die Spezifität der verfügbaren Rezeptor-Blocker zu gering war.

Läßt sich über die Kombinationen β -Rezeptor (stim.) + inhibitorischer Effekt (α -Agonisten, Histamin, Adenosin) hinaus noch ein größerer Satz von Eigenschaften angeben, den eine bestimmte Population von Zellen in diesen Kulturen besitzt? Folgende Beobachtungen scheinen dies zu ermöglichen:

- 1) Die β -adrenerg gesteigerten cAMP-Spiegel erreichen sehr hohe Werte, wie sie auch im homogenen Zellmaterial permanenter Gliomazell-Linien gemessen werden. Dies deutet darauf hin, daß ein sehr großer Anteil der Zellen in den Primärkulturen über den entsprechenden Rezeptor verfügt.
- 2) Die Größe des α -adrenergen inhibitorischen Effekts deutet darauf hin, daß ein großer Teil der Zellen die entsprechenden Rezeptoren besitzt.
- 3) In Abwesenheit von MIBX wird die β -adrenerg stimulierte Akkumulation von cAMP durch Adenosin vollständig gehemmt. Dies ist nur zu erklären, wenn alle β -adrenerg stimulierten Zellen adenosinempfindlich sind.
- 4) Die Anzahl verschiedener Zelltypen in den Kulturen ist begrenzt: die mutmaßlichen Glioblasten machen den Großteil der vorhandenen Zelltypen aus (vgl. Abschnitt 2.2.1).

Diese Beobachtungen führen uns zu folgender Arbeitshypothese: Primärkulturen aus dem Gehirn perinataler Mäuse enthalten nach einer Kulturzeit von 3-4 Wochen einen hohen Anteil eines Zelltyps (oder mehrerer, in dieser Beziehung und morphologisch gleicher Zelltypen), der folgende differenzierte Eigenschaften ausprägt:

- 1) β -adrenerge Rezeptoren, deren Stimulierung zur Aktivierung der Adenylatcyclase führt;
- 2) Hemmbarkeit der stimulierten cAMP-Akkumulation durch Adenosin.

Ein Großteil der durch diese beiden Eigenschaften charakterisierten Zellen (oder alle) muß zusätzlich α -Rezeptoren haben,

die inhibitorische Effekte auf den cAMP-Spiegel vermitteln. Ein weiterer Teil dieser Zellen muß sensitiv für die hemmenden Wirkungen von Histamin bzw. H₁-Agonisten sein. Inwiefern diese beiden Subklassen (α -Rezeptor ausprägend bzw. für Histamin (inhibierend) sensitiv) miteinander identisch sind, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entschieden werden. Ebenfalls derzeit nicht beantwortbar ist die Frage, ob die Rezeptoren, die die cAMP-steigernden Effekte von Histamin bzw. Adenosin vermitteln, auf den oben beschriebenen Zelltypen oder auf weiteren Zellklassen lokalisiert sind. Die bei klonalen, permanenten Zell-Linien transformierter Gliazellen gefundene Kombination von cAMP-Akkumulation stimulierenden Rezeptoren (β -adrenerg, Histamin, Adenosin, Prostaglandin E₁) (28-30) läßt allerdings vermuten, daß auch die stimulatorischen Histamin- und Adenosin-Rezeptoren auf den β -adrenerg stimulierbaren Zellen lokalisiert sind. Interessant ist vor allem die Frage, ob, in Analogie zu NA, die stimulatorischen und inhibitorischen Einflüsse von Histamin bzw. Adenosin ebenfalls auf jeweils denselben Zelltyp wirken. Die zur Untersuchung dieser Frage notwendige selektive Blockierung des inhibitorischen Effekts (die, bei positivem Ausgang des Experiments, zu einem erhöhten stimulatorischen Effekt führen sollte), gelang bisher wegen der mangelnden Selektivität der verfügbaren Antagonisten noch nicht.

Weder α -Agonisten, noch Adenosin, noch Histamin hemmen den PGE₁-stimulierten Anstieg des cAMP-Spiegels in Primärkulturen. Zwei Erklärungsmöglichkeiten dafür sind denkbar:

- 1) Die PGE₁-sensitiven Zellen repräsentieren eine weitere Zellklasse, die von den oben diskutierten Zelltypen verschieden und insensitiv gegen die entsprechenden inhibitorischen Einflüsse ist.
- 2) Die PGE₁-sensitiven Zellen sind, wenigstens zum Teil, identisch mit den Zellen, deren β -adrenerg stimulierte cAMP-Akkumulation durch Adenosin, Histamin und α -Agonisten hemmbar ist. Die Steigerung der cAMP-Spiegel durch PGE₁ ist aber dem hemmenden Einfluß nicht unterworfen.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die PGE_1 -stimulierte cAMP-Akkumulation in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen durch σ -adrenerge Agonisten (185) und durch Adenosin (228) sehr wohl hemmbar ist. Da es wegen der ungewöhnlichen Dosis-Wirkungskurven für PGE_1 und PGE_2 an Primärkulturen ohnehin fraglich erscheint, ob die Effekte beider Agentien auf der Stimulierung spezifischer Rezeptoren beruhen (vgl. Abschnitt 2.2.2.4), erscheint eine weitere Diskussion verfrüht.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte von Hormon-Kombinationen auf die cAMP-Spiegel in kultivierten Hirnzellen scheinen die Möglichkeit zu bieten, die Sensitivität eines Zelltyps gegenüber verschiedenen Hormonen und Hormon-Kombinationen zu bestimmen. In Verbindung mit den bereits bekannten oder diskutierten biochemischen Identitätsmarkern für Glia- bzw. Nervenzellen (vgl. Abschnitt 2.4 und (259)), könnte die Kenntnis solcher Eigenschaftskombinationen für die Gewinnung einheitlicher Kulturen differenzierter, untransformierter Hirnzellen von großem Vorteil sein.

2.3 Wirkung von Neurohormonen auf Ratten-Gliomazellen C6

Durch einen Vergleich von Ergebnissen, die an verschiedenen Modellsystemen gewonnen werden, kann die Verlässlichkeit einer bestimmten Information überprüft werden (siehe Einleitung). Es schien daher interessant, die an primären, nicht-neuronalen Zellen - einem Modellsystem untransformierter Gliazellen - gewonnenen Daten mit den Eigenschaften von Ratten-Gliomazellen C6 als Beispiel einer permanenten Linie transformierter Gliazellen zu vergleichen. Eine Reihe differenzierter Funktionen dieser Zell-Linie wurde schon beschrieben (vgl. Einleitung).

Einige der im folgenden beschriebenen Versuche, bei denen keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollen festgestellt wurden, sind nur tabellarisch zusammengefaßt, ohne Angabe der einzelnen Meßergebnisse. Die in Abschnitt 2.3.3 (Abb. 20) dargestellten Meßwerte (cAMP- und cGMP-Gehalt der Zellen nach Inkubation mit Carbamylcholin) sind repräsentativ für die Streuung und die Standardabweichungen der Werte in diesen Versuchen.

2.3.1 Adrenerge Agonisten

Aus einer früheren Arbeit war bekannt, daß die steigernde Wirkung adrenerger Agonisten auf den cAMP-Spiegel in C6-Gliomazellen über einen β -adrenergen Rezeptor vermittelt wird. Im Gegensatz zu den Ergebnissen an Primärkulturen (siehe Abschnitt 2.2.2.1) ergaben die Dosis-Wirkungskurven sowie die Effekte spezifischer Antagonisten bei einer Inkubationszeit von 15 min jedoch keinen Hinweis auf eine gleichzeitige Stimulierung eines α -Rezeptors (32).

Um auszuschließen, daß diesem Unterschied zwischen beiden Glia-Modellsystemen etwa nur ein unterschiedlicher Zeitver-

lauf der Aktivierung der beiden Rezeptoren zu Grunde liegen könnte, wurde die Steigerung der cAMP-Spiegel in Primärkulturen und Gliomazellen auch nach 30 sek und 5 min Inkubation mit NA in An- und Abwesenheit der spezifischen Inhibitoren untersucht (Abb. 19). Während in Primärkulturen die Blockierung des α -Rezeptors durch Phentolamin auch nach 30 sek und 5 min zu einer Steigerung des Effektes von NA führt (Abb. 19 A, Kurven I und II bzw. III und IV), bleibt der Effekt bei C6-BU-1-Gliomazellen unbeeinflusst (Abb. 19 B, Kurven I und II bzw. III und IV). Ein entsprechender Versuch mit C6-(Wildtyp-) Zellen hatte das gleiche negative Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Dagegen wird sowohl bei Primärkulturen wie bei Gliomazellen die Steigerung des cAMP-Spiegels durch NA von dem β -adrenergen Antagonist Propranolol gehemmt (Abb. 19 A und B, Kurven V und VI).

Neben den cAMP-Werten der Abb. 19 B wurde bei den C6-BU-1-Gliomazellen auch der intrazelluläre cGMP-Gehalt gemessen. Es ergaben sich keine signifikanten Abweichungen vom Basiswert (1.45 ± 0.15 pMol/mg Protein). Auch Messungen der cGMP-Spiegel nach 15 sek Inkubation mit NA (1 pM bis 0.1 mM) in An- und Abwesenheit von 10 μ M Propranolol bzw. Phentolamin ergaben keine Änderung gegenüber den Kontrollen. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, daß C6-Gliomazellen einen α -Rezeptor besitzen, der den Spiegel der cyclischen Nukleotide beeinflusst.

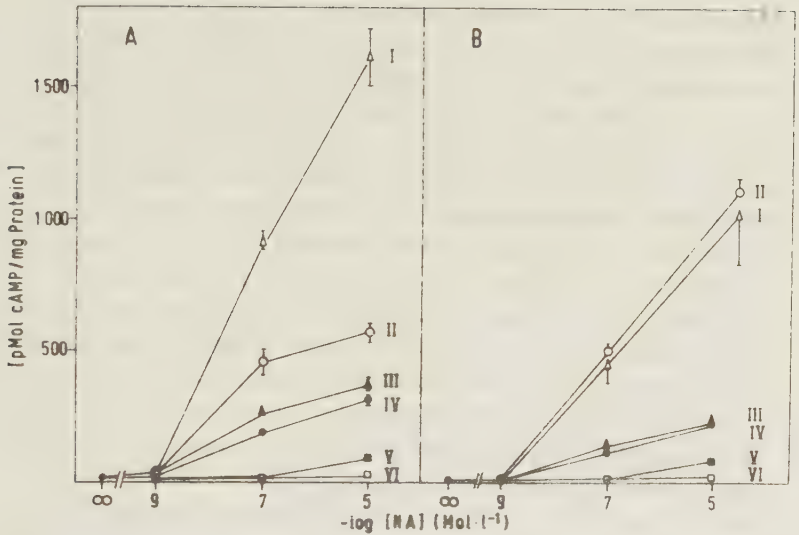


Abb. 19 Effekte von Phentolamin (10 μ M) und Propranolol (10 μ M) auf die Steigerung der cAMP-Spiegel durch NA in Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen (A) und C6-BU-1-Gliomazellen (B) nach verschiedenen Inkubationszeiten.
Kurve I: NA + Phentolamin, 5 min; Kurve II: NA ohne Antagonist, 5 min; Kurve III: NA + Phentolamin, 30 sek; Kurve IV: NA ohne Antagonist, 30 sek; Kurve V: NA + Propranolol 30 sek; Kurve VI: NA + Propranolol, 5 min.
Primärkulturen aus perinatalen Mäusen, 26 Tage in Kultur, 2.2 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser) (A). C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 27, 2.7×10^7 lebensfähige Zellen und 3.5 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser) (B). Die Testinkubationen der Primärkulturen erfolgten in Gegenwart von 0.5 mM MIBX.

2.3.2 Histamin und Adenosin

Histamin und Adenosin bewirken in Primärkulturen des Gehirns sowohl einen Anstieg des cAMP-Spiegels als auch eine Hemmung der β -adrenerg stimulierten cAMP-Akkumulation (siehe Abschnitt 2.2.2.2 und 2.2.2.3 dieser Arbeit). C6-Gliomazellen zeigen dagegen nach Inkubation mit beiden Agentien in 0.1 mM Konzentration keinen erhöhten cAMP-Spiegel (32, 34). Untersuchungen bei einer Konzentration und einer Inkubationszeit können jedoch die Abwesenheit der Wirkung eines Agens auf eventuell kreuz-inhibitorische sekundäre Effektoren nicht schlüssig zeigen (260).

In dieser Arbeit wurden daher die Effekte beider Drogen auf die Spiegel der cyclischen Nukleotide bei einer Reihe weiterer Konzentrationen und kürzeren Inkubationszeiten sowie in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren getestet. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine der Drogen in Analogie zu den Primärkulturen einen inhibitorsichen Einfluß auf β -adrenerg gesteigerte cAMP-Spiegel hat. Tab. 21 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Versuche. In keinem Fall wurden signifikante und reproduzierbare Änderungen des Gehalts an cyclischen Nukleotiden im Vergleich zu den Kontrollen (Inkubation mit den entsprechenden Zusätzen ohne Agonist) gefunden. Ein möglicher Effekt von Histamin auf den cGMP-Spiegel der Zellen bei langen Inkubationszeiten und hohen Konzentrationen bedarf der Überprüfung.

Tab. 21 Untersuchungen zur Wirkung von Adenosin und Histamin auf den Spiegel cyclischer Nukleotide in C6-BU-1-Gliomazellen. Hinter der Anzahl der durchgeführten Versuche ist in Klammern diejenige Anzahl von Versuchen angegeben, bei denen das Inkubationsmedium 2-3 h vor Versuchsbeginn zugegeben wurde (siehe Abschnitt 3.4.3). In der Spalte "Maximale Abweichung" ist die jeweils höchste Abweichung vom Kontrollwert in Prozent ($\frac{\text{gemessener Wert} - \text{Kontrollwert}}{\text{Kontrollwert}} \times 100$) angegeben, soweit diese statistisch signifikant war (mehr als eine Standardabweichung Unterschied zwischen den Mittelwerten). Die Standardabweichungen der Werte betrugen in der Regel 10-20%.

Zusatz (μM)	cycl. Nukleotid	-log [Agonist] ($\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	Inkub.- Zeit (min)	maximale Änderung (% des Kon- trollwertes)	Anzahl der Ver- suche
Histamin	cAMP	10,8,6,4	5, 10	+100 ^{a)}	5(3)
Histamin + MIBX (500)	cAMP	6,4	10	+10 ^{a)}	4(2)
Histamin + NA (100)	cAMP	4	10	0	2(1)
Histamin + NA (0,1)	cAMP	4	10	0	(1)
Histamin + Iprot (100) + MIBX	cAMP	4	10	0	1
Histamin + Iprot (100) + MIBX + Pyrilamin (100)	cAMP	4	10	0	1
Histamin + Iprot (100) + MIBX + Metiamid (100)	cAMP	4	10	0	1
Histamin	cGMP	10,9,8,6	1,5, 10	+100 ^{b)}	1
Adenosin	cAMP	9,7,6,4	1,5, 10	+100 ^{a)}	4(3)
Adenosin	cGMP	10,8,6	5	0	1
Adenosin + MIBX	cAMP	4	10	0	2(1)
Adenosin + PGE ₁ (5)	cAMP	4	10	0	1
Adenosin + PGE ₁ (5) + MIBX	cAMP	4	10	0	1
Adenosin + Iprot (100)	cAMP	4	10	0	1
Adenosin + Iprot (100) + MIBX	cAMP	4	10	0	1
Adenosin + Theophyllin (100)	cAMP	4	10	0	1
Adenosin + Iprot (100) + Theophyllin (100)	cAMP	4	10	0	1

a) Abweichung vom Kontrollwert nicht reproduzierbar

b) Verdoppelung des Kontrollwertes bei 1 μM , 10 min Inkubation, kein Effekt unter den anderen Bedingungen

2.3.3 Carbamylcholin

C6-BU-1-Gliomazellen besitzen Rezeptoren für AcCh, wie durch elektrophysiologische Untersuchungen gezeigt werden konnte (36). Es wurde untersucht, ob die Aktivierung dieser Rezeptoren außer zu einer Erhöhung des Membranpotentials auch zu einer Änderung des Spiegels cyclischer Nukleotide in den Zellen führt. Die Messungen mußten in einem weiten Konzentrations- und Zeitbereich durchgeführt werden, da bei einem möglichen mehrphasigen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven Effekte nicht bei allen Konzentrationen und Inkubationszeiten feststellbar sind (260). Für die Untersuchungen wurde Carbamylcholin, ein gegen AcChE resistenter cholinerg Agonist, verwendet. Eine signifikante Änderung des Gehaltes der Zellen an cyclischen Nukleotiden ist nicht zu erkennen (Abb. 20).

Falls in Analogie zu den Effekten von NA, Adenosin und Histamin auf Primärkulturen Carbamylcholin sowohl einen stimulierenden wie einen hemmenden Einfluß auf die Akkumulation von cAMP haben sollte, so könnte dadurch ein cAMP-steigernder Effekt maskiert werden. Derartige Effekte sollten sich aber in Anwesenheit der spezifischen nicotinischen bzw. muscarinischen Antagonisten D-Tubocurarin bzw. Atropin auffinden lassen, falls ein hemmender Einfluß über einen solchen Rezeptor vermittelt würde. Tab. 22 zeigt, daß auch in Anwesenheit der erwähnten Antagonisten Carbamylcholin in 0.1 mM Konzentration weder einen cAMP-steigernden Effekt hat, noch einen inhibitorischen Einfluß auf eine β -adrenerg stimulierte cAMP-Akkumulation ausübt. Die Inkubationen wurden in Gegenwart des Phosphodiesterase-Inhibitors (183, 184) MIBX durchgeführt.

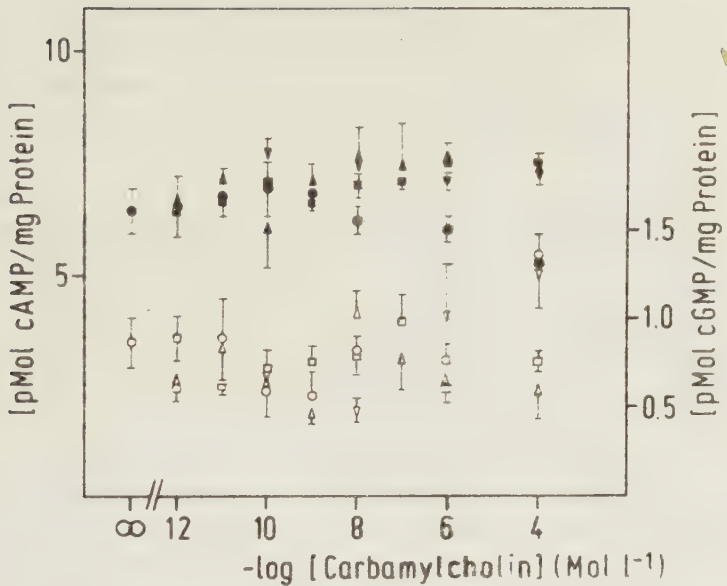


Abb. 20 Carbamylcholin hat keinen Effekt auf den Spiegel cyclischer Nukleotide in C6-BU-1-Gliomazellen. Passage 24, 5.8×10^7 lebende Zellen und 7.2 mg Protein/Platte (85 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit 99%. Wechsel gegen Inkubationsmedium 2 h vor Versuchsbeginn (siehe Abschnitt 3.4.3). Offene Symbole: cGMP, geschlossene Symbole: cAMP. Inkubation mit Carbamylcholin für 0.5 min (○) 1 min (Δ), 5 min (□) und 10 min (▽). Aus Platzgründen nicht eingezeichnete Standardabweichungen sind 10-20%.

Tab. 22 Carbamylcholin (0.1 mM) in An- und Abwesenheit von cholinergen Antagonisten hat keinen Einfluß auf Basal-Werte oder β -adrenerg gesteigerte cAMP-Spiegel von C6-BU-1-Gliomazellen. Passage 24, 1.8×10^7 Zellen und 1.8 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit 99%.

Zusatz (μ M)	cAMP (pMol/mg Protein)
MIBX (500)	$42^{\pm} 10$
MIBX + Carbamylcholin (100)	$24^{\pm} 4$
MIBX + Atropin (100)	$30^{\pm} 1$
MIBX + Tubocurarin (100)	$46^{\pm} 1$
MIBX + Carbamylcholin + Atropin	$35^{\pm} 5$
MIBX + Carbamylcholin + Tubocurarin	$39^{\pm} 2$
MIBX + Iprot (1)	$2100^{\pm} 160$
MIBX + Iprot + Atropin	$2660^{\pm} 430$
MIBX + Iprot + Tubocurarin	$2340^{\pm} 200$
MIBX + Carbamylcholin + Iprot	$1970^{\pm} 80$
MIBX + Carbamylcholin + Iprot + Atropin	$2020^{\pm} 120$
MIBX + Carbamylcholin + Iprot + D-Tubocurarin	$2250^{\pm} 90$

Es erscheint somit wenig wahrscheinlich, daß der elektro-physiologisch nachgewiesene (36) cholinerge Effekt auf das Membranpotential der Gliomazellen über eine Änderung des Spiegels cyclischer Nukleotide vermittelt wird.

2.3.4 Untersuchungen zur Wirkung weiterer pharmakologisch aktiver Substanzen

C6-Gliomazellen besitzen aktive, Na^+ -abhängige Aufnahmesysteme für die beiden mutmaßlichen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und Taurin und können letzteres auch synthetisieren (19, 158). Beide Agentien beeinflussten dagegen bei den in dieser Arbeit getesteten Konzentrationen und Inkubationszeiten nicht den Gehalt der Zellen an cyclischen Nukleotiden. Auch ein Einfluß auf β -adrenerg gestiegerte cAMP-Spiegel konnte nicht festgestellt werden. Ebenfalls ohne Effekt auf den Spiegel cyclischer Nukleotide in den Zellen waren der Neurotransmitter Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), der mutmaßliche Neurotransmitter ATP (206) sowie Melatonin. Tab. 23 faßt die durchgeführten Versuche zusammen.

Eine Reihe pharmakologisch sehr wirksamer Peptide wurde ebenfalls getestet. Bradykinin, ein Nonapeptid (261, 262) und Substanz P, ein Undecapeptid (262, 264), das möglicherweise eine Neurotransmitterfunktion hat (263-266), ergaben in je einem Fall eine leichte Steigerung des cAMP-Spiegels, die jedoch bei mehrfacher Wiederholung des Versuches nicht reproduziert werden konnte. Tab. 24 faßt die mit diesen Substanzen durchgeführten Versuche zusammen. Ein Effekt auf den cGMP-Spiegel der Zellen sowie auf β -adrenerg gestiegerte cAMP-Spiegel wurde nicht beobachtet.

Bradykinin wird durch das "Angiotensin converting enzyme" (267) inaktiviert. Falls dieses Enzym in der Kultur vorhanden ist, könnte seine Aktivität von nicht genau kontrollierbaren Parametern beeinflusst werden (etwa: Charge des verwendeten Serums). Es wurde daher untersucht, ob in Gegenwart eines Inhibitors dieses Enzyms ("Angiotensin converting enzyme inhibitor", ACEI) (268) Effekte von Bradykinin beob-

Tab. 23 Untersuchungen zur Wirkung von mutmaßlichen Neurotransmittern auf den Spiegel cyclischer Nukleotide in C6-BU-1-Gliomazellen, Passagen 23-33. Erläuterungen siehe Tab. 21.

Zusatz (µM)	cycl. Nukleotid	-log {Agonist} ₁ (Mol·l ⁻¹)	Inkub.-Zeit (min)	maximale Änderung (% des Kontrollwertes)	Anzahl der Versuche
Melatonin	cAMP	10-4	1,5,10	0	4(3)
Melatonin + MIBX (500)	cAMP	10,8,6,4	10	0	1(1)
Melatonin	cGMP	12-6,4	0,5, 1,5, 10	200 ^{a)}	3(2)
ATP	cAMP	10-4	1,5,10	0	2(2)
ATP	cGMP	12-9,7,6	1,5	0	2(1)
GABA	cAMP	9,7,6,4	1,5,10	90 ^{a)}	5(3)
GABA + MIBX	cAMP	4	10	0	3(1)
GABA + NA (100)	cAMP	4	10	0	2
GABA + NA (0.1)	cAMP	4	10	10	(1)
GABA + Iprat (1) + MIBX	cAMP	4	10	0	1
GABA	cGMP	10,8,6	5	0	1
Serotonin	cAMP	4	5,10	0	4(3)
Serotonin + MIBX	cAMP	4	10	0	2(1)
Serotonin + NA (100)	cAMP	4	10	0	1
Serotonin	cGMP	10,8,6	5	0	1
Taurin	cAMP	4	5,10	0	3(2)
Taurin + MIBX	cAMP	4	10	0	(1)
Taurin + NA (100)	cAMP	4	10	0	1
Taurin + NA (0.1)	cAMP	4	10	0	1
Taurin	cGMP	10,8,6	5	0	1

a) Abweichung vom Kontrollwert nicht reproduzierbar

Tab. 24 Untersuchungen zum Einfluß von Bradykinin und Substanz P auf den Spiegel cyclischer Nukleotide in C6-BU-1-Gliomazellen (Passagen 23-33). Erläuterungen siehe Tab. 21.

Zusatz (µM)	cycl. Nukleotid	-log {Agonist} (Mol·l ⁻¹)	Inkub.-Zeit (min)	maximale Änderung (% des Kontrollwertes)	Anzahl der Versuche
Bradykinin	cAMP	9-4	5,10	250 ^{a)}	5(4)
Bradykinin + MIBX (500)	cAMP	9,8,5,4	10	0	4(2)
Bradykinin + NA (100)	cAMP	10-7,5	10	0	3(2)
Bradykinin + NA (0.1)	cAMP	4	10	0	(1)
Bradykinin	cGMP	6	10	0	1
Substanz P	cAMP	5,4	5,10	100 ^{a)}	4(3)
Substanz P + MIBX	cAMP	4	10	0	3(2)
Substanz P + NA (100)	cAMP	4	10	0	2(1)
Substanz P + NA (0.1)	cAMP	4	10	0	(1)
Substanz P	cGMP	10,8,6	5	0	1

a) Abweichung vom Kontrollwert nicht reproduzierbar

achtet werden könnten. Tab. 25 zeigt, daß auch in Gegenwart dieses Inhibitors Bradykinin weder den basalen noch den β -adrenerg gesteuerten cAMP-Spiegel beeinflußt. Bei der verwendeten Inhibitorkonzentration (5 μ M) sollte die Enzymaktivität vollständig gehemmt sein (268).

Tab. 25 Bradykinin hat keinen Einfluß auf den basalen oder β -adrenerg gesteuerten cAMP-Spiegel in C6-BU-1-Gliomazellen. 6.1×10^7 lebende Zellen und 8 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser), Passage 25, Lebensfähigkeit >99%.

Zusatz (μ M)	cAMP (pMol/mg Protein)	
	ohne NA	mit NA (10 μ M)
Kontrolle	19 $\pm$ 2	3920 $\pm$ 550
MIBX (500)	49 $\pm$ 4	-
ACEI (5)	16 $\pm$ 2	4130 $\pm$ 220
ACEI + MIBX	51 $\pm$ 4	-
Bradykinin (1)	13 $\pm$ 0.3	4120 $\pm$ 180
Bradykinin + MIBX	49 $\pm$ 4	-
Bradykinin + ACEI - Faktor	22 $\pm$ 4	4110 $\pm$ 430
Bradykinin + ACEI - Faktor + MIBX	53 $\pm$ 11	-

Ubiquitin ist ein in allen untersuchten Geweben gefundenes Polypeptid, das die Differenzierung von Prothymocyten und B-Zellen (269) sowie eine Stimulierung der Adenylatcyclase in einer Reihe von Geweben (270) bewirkt. Beide Effekte sollen über einen β -adrenergen Rezeptor vermittelt sein (271). Falls Ubiquitin tatsächlich β -mimetische Effekte hat, so sollte es auch bei C6-BU-1-Gliomazellen über den β -adrenergen

Tab. 26 Ubiquitin und Somatomedin haben keinen Einfluß auf den basalen oder β -adrenerg gesteuerten cAMP-Spiegel in C6-BU-1-Gliomazellen. Exp. 1: 0.9×10^7 lebende Zellen und 1.2 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Passage 24, Lebensfähigkeit >99%; Exp. 2: 6.1×10^7 lebende Zellen und 8 mg Protein pro Platte (85 mm Durchmesser) Passage 25, Lebensfähigkeit >99%.

Zusatz (Konzentration)	cAMP (pMol/mg Protein)	
	ohne NA	mit NA (10 μ M)
Exp. 1 Kontrolle	$9^{\pm} 1$	$4430^{\pm} 420$
MIBX (0.5 mM)	$46^{\pm} 8$	$4640^{\pm} 200$
Ubiquitin (0.1 nM)	$10^{\pm} 3$	$4010^{\pm} 270$
Ubiquitin (10 nM)	$9^{\pm} 3$	$4070^{\pm} 220$
Ubiquitin (1 μ M)	-	$4040^{\pm} 260$
Ubiquitin (0.1 nM) + MIBX	$41^{\pm} 9$	$4580^{\pm} 90$
Ubiquitin (10 nM) + MIBX	$41^{\pm} 4$	$4630^{\pm} 730$
Ubiquitin (1 μ M) + MIBX	$40^{\pm} 2$	$4310^{\pm} 360$
Exp. 2 Kontrolle	$19^{\pm} 2$	$3920^{\pm} 550$
MIBX (0.5 mM)	$49^{\pm} 4$	
Somatomedin (1.7 μ g/ml)	-	$4780^{\pm} 350$
Somatomedin (6.8 μ g/ml)	$15^{\pm} 1$	$4550^{\pm} 390$
Somatomedin (6.8 μ g/ml) + MIBX	$51^{\pm} 2$	-

Rezeptor zu einer Steigerung des cAMP-Gehaltes führen. Tab. 26 zeigt, daß Ubiquitin (zur Verfügung gestellt von E. Eylar, Toronto) in dem Konzentrationsbereich, in dem es eine Differenzierung von T- und B-Zellen induziert (1.2 nM, berechnet nach Daten aus (271)), keine Änderung des cAMP-Gehaltes der Gliomazellen bewirkt. Auch bei Inhibition der Phosphodiesterase

durch MIBX sowie nach Stimulierung der Zellen mit NA hat Ubiquitin, auch bei höheren Konzentrationen, keinen Effekt. Da zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit die Daten zur Aktivierung der Adenylatcyclase über β -adrenerge Rezeptoren durch Ubiquitin (270) noch nicht zugänglich waren und höhere Konzentrationen aus Mangel an Material bislang nicht getestet wurden, erscheint eine Diskussion verfrüht.

Tab. 26 enthält auch die Ergebnisse eines zweiten Experiments, bei dem die Wirkung von Somatomedin auf basale und β -adrenerg gesteigerte cAMP-Spiegel in C6-BU-1-Gliomazellen untersucht wurde. Somatomedin (272) ist ein von Wachstumshormon abhängiger Plasma-Faktor, der den Einbau von Sulfat in Chondroitinsulfat (273) von Thymidin in DNS (274), von Prolin in das Hydroxyprolin des Kollagen (275) sowie von Uridin in RNS (276) stimuliert. Es wurde berichtet, daß Somatomedin die Aktivität von Adenylatcyclase in einer Reihe von Geweben hemmt (277). Auf den cAMP-Gehalt in C6-BU-1-Gliomazellen in An- und Abwesenheit von MIBX sowie auf die β -adrenerg stimulierte cAMP-Akkumulation hatte eine angereicherte somatomedin-haltige Serum-Fraktion (zur Verfügung gestellt von Dr. Volker Krug, 2. Mediz. Klinik, München) keinen signifikanten Einfluß (Tab. 26, Exp. 2).

2.4 Diskussion der Effekte von Neurohormonen auf die intrazellulären Spiegel der cyclischen Nukleotide in Primärkulturen und Gliomazellen.

2.4.1 Effekte auf den cAMP-Spiegel der Zelle

In dieser Arbeit wurden die Effekte verschiedener Neurotransmitter und Hormone auf die intrazelluläre Akkumulation von cAMP in zwei Glia-Modellsystemen untersucht: Ratten-Gliomazellen C6 als Beispiel einer permanenten, transformierten Gliazell-Linie und Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen als Beispiel untransformierter Zellen. Die wichtigsten, an beiden Systemen untersuchten Eigenschaften sind, zusammen mit den Ergebnissen anderer Autoren, in Tab. 27 zusammengefaßt. Mit bemerkenswerter Übereinstimmung werden diese Eigenschaften, die alle auch als spezifische "Marker" für Gliazellen diskutiert werden (259), in beiden Modellsystemen gefunden. Ausnahmen sind 1) das Fehlen von cAMP-steigernden Adenosin- und Histamin-Rezeptoren in Ratten-Gliomazellen, (die beide aber in menschlichen Astrocytomazellen beobachtet werden (28-30)), und 2) das Fehlen von jeglichen, einer cAMP-Akkumulation entgegen wirkenden Effekten von Neurohormonen bei Gliomazellen.

Die Unterschiede zwischen beiden Glia-Modellsystemen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf kontaminierende Neuronen oder Mesenchymzellen in den Primärkulturen zurückzuführen. Wie schon diskutiert (vgl. Abschnitt 2.2.4), spricht die Größe der beobachteten inhibitorischen Effekte für eine Beteiligung eines Großteils der Zellen; die Anwesenheit von stimulatorischen Histamin- und Adenosin-Rezeptoren auf menschlichen Astrocytomazellen legt nahe, daß diese Rezeptoren auch in den Primärkulturen auf Gliazellen lokalisiert sind.

Wahrscheinlicher ist eine Dedifferenzierung der Gliomazellen durch häufiges Subkultivieren und/oder den Prozeß der Transformierung. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die Glioma-Linien aus einem Gliazelltyp abgeleitet sind, der die entsprechenden Funktionen auch im untransformierten Zustand und in situ nicht besitzt.

Tab. 27 Differenzierte Funktionen in Glia-Modellsystemen

Funktion:	Primärkulturen (Literatur) Glioblasten?	Gliomazellen (Literatur)
aktive Aufnahme von:		
a) Taurin	+ (147)	+ (19)
b) GABA	+ (151)	+ (19, 158)
c) Glutamat	+ (151, 148)	+ (157)
Induzierbarkeit der Glycerin- phosphat-Dehydrogenase		
	+ (120)	+ (39)
GFA-Protein	+ (146)	+ (41, 42)
Erhöhung des cAMP- Spiegels durch:		
a) β -adrenerge Agonisten	+ (142 und diese Arbeit)	+ (28, 32)
b) Prostaglandin E	+ (142 und diese Arbeit)	+ (30, 33)
c) Histamin	+ (diese Arbeit)	+ (28) -(32,34, und diese Arbeit)
d) Adenosin	+ (142 und diese Arbeit)	+ (29) -(32,34, und diese Arbeit)
Absenkung β -adrenerg er- höhter cAMP-Spiegel durch:		
a) α -adrenerge Agonisten	+ (diese Arbeit)	- (diese Arbeit)
b) Histamin, H1-Agonisten	+ (diese Arbeit)	- (diese Arbeit)
c) Adenosin	+ (diese Arbeit)	- (diese Arbeit)

Aus der Fülle von möglichen Erklärungen für die unterschiedlichen Eigenschaften von Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen und klonalen Gliomazell-Linien seien hier nur zwei extreme Alternativen formuliert:

1) Die Eigenschaften der Primärkulturen repräsentieren die Summe der Eigenschaften vieler verschiedener Zelltypen. Die Gliomazellen sind die transformierte Form eines von vielen in vivo existierenden Gliazelltypen, über dessen Anwesenheit in den Primärkulturen keine Aussagen gemacht werden können. Die Sensitivität gegenüber inhibitorischen Einflüssen auf den β -adrenerg gesteuerten cAMP-Spiegel ist eine Eigenschaft eines von vielen Gliazelltypen, der in den Primärkulturen zufällig besonders stark vertreten sein könnte.

2) Sensitivität gegen simultane, stimulierende und hemmende Einflüsse eines Hormons ist eine wichtige funktionelle Eigenschaft von Gliazellen. Die Ausprägung dieser Eigenschaft kann beeinträchtigt werden durch Transformation, Subkultivierung und/oder das Fehlen bestimmter differenzierender Stimuli. Analoges gilt für die Ausprägung von Adenosin- und Histamin-Rezeptoren.

Die zweite Alternative würde wesentlich attraktiver, wenn weitere Untersuchungen zeigen sollten, daß nicht nur adrenerge Agonisten, sondern auch Adenosin und Histamin jeweils beide (gegenläufige) Wirkungen auf demselben Zelltyp ausüben (vgl. Abschnitt 2.2.4). Eine solche Rezeptorkombination würde es der Zelle ermöglichen, die maximale intrazelluläre Reizantwort auf einen definierten Sollwert einzustellen. Änderungen dieser Sollwerteinstellung als Reaktion auf bestimmte Stimuli wären z.B. möglich durch Variation des Mengenverhältnisses beider Rezeptortypen und/oder ihrer Interaktion mit "second messenger"-Systemen.

2.4.2 Effekte auf den cGMP-Spiegel der Zelle

Hormone, die eine Absenkung des cAMP-Spiegels bewirken, sollen in einigen Systemen eine Steigerung des cGMP-Gehaltes der Zellen auslösen (25, 171). Eine derartige Wirkung konnte aber in dieser Arbeit weder an untransformierten Hirnzellen noch an Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen nachgewiesen werden. Auch keines der an Ratten-Gliomazellen getesteten Agentien hatte einen erkennbaren Effekt auf den cGMP-Spiegel. Eine Reihe von Erklärungen für dieses negative Resultat bieten sich an:

- 1) Gliazellen könnten prinzipiell keine Guanylatcyclase besitzen (156). Die gemessenen Basiswerte müßten dann durch die Anwesenheit eines unbekannten Faktors in den Kulturen erklärt werden, der sich in den Tests auf Proportionalität und Wiederfindung (siehe Abschnitt 2.1.2.5) wie cGMP verhält.
- 2) Die Änderungen der cGMP-Spiegel könnten so gering sein, daß sie nicht mehr innerhalb der Signifikanzgrenze des verwendeten Tests liegen.
- 3) Eine Änderung der cGMP-Spiegel könnte nur bei sehr ungewöhnlichen Inkubationszeiten und/oder Hormon-Konzentrationen feststellbar sein.
- 4) Die cAMP- und die cGMP-Spiegel in den Zellen könnten unabhängig voneinander reguliert werden. Eine gegenläufige Änderung wäre dann ein Spezialfall.

Das Fehlen jeglicher mit dem verwendeten Test nachweisbarer Veränderungen der cGMP-Spiegel in Primärkulturen und Ratten-Gliomazellen nach Inkubation mit diversen Neurohormonen kann also sicher nicht als unvereinbar mit der postulierten (170) "second messenger" Funktion dieses cyclischen Nukleotides gewertet werden. Die Ergebnisse berechtigen aber zu Zweifeln an der universellen Gültigkeit der von Goldberg und Mitarbeitern (171) aufgestellten "Yin-Yang"-Hypothese.

2.5 Vorbereitende Arbeiten zum Studium von Primärkulturen neuronaler Zellen.

Das größte Hemmnis für die Untersuchung der Eigenschaften von Neuronen in Primärkultur ist der Mangel eines genügend definierten Untersuchungssystems. Bislang sind keine Methoden bekannt, die es erlauben, Neuronen aus dem Gehirn frei von nicht-neuronalen Zellen zu kultivieren (vgl. Einleitung). Nach den hier vorgelegten Untersuchungen stehen nun Kulturen nicht-neuronaler Zellen zur Verfügung, deren Reaktion auf die Stimulation mit diversen Hormonen und Hormonkombinationen schon recht gut charakterisiert ist. Neuroblasten aus jungen Embryonen, die auf einer Schicht derartiger Zellen kultiviert werden, entwickeln sich zu morphologisch gut differenzierten Neuronen (121). Damit ist jetzt die Möglichkeit gegeben, Nervenzellen in einem Kultursystem zu untersuchen, dessen nicht-neuronale Elemente bereits charakterisiert sind. Die Zuordnung eines gemessenen Effekts zu einem der beiden Zelltypen ist damit wesentlich erleichtert.

Derartige heterotypische, aber vergleichsweise gut definierte Kulturen wären ein Modellsystem untransformierter Nervenzellen, dessen Untersuchung die an homotypischen, aber transformierten Modellzellen (Neuroblastomazellen und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen) gewonnenen Erkenntnisse wesentlich ergänzen könnte. Besonders interessant erscheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt vor allem die Untersuchung folgender Probleme an solchen Kulturen:

- 1) Wirkung von Opiaten und Neurohormonen; Vergleich mit den Erkenntnissen aus Untersuchungen an klonalen, permanenten Zell-Linien (175);
- 2) Biosynthese nervensystem-spezifischer Peptide;
- 3) Biochemie der Synaptogenese.

Eine weitere Fraktionierung solcher heterotypischer, neuro-nenhaltiger Kulturen ist an die gleichen Voraussetzungen ge-

bunden, wie die von Kulturen nicht-neuronaler Zellen: zunächst muß ein bestimmter Satz von differenzierten Funktionen charakterisiert werden, der zur Identitätsmarkierung des entsprechenden Zelltyps dienen kann. Zur Vorbereitung solcher Untersuchungen wurden zwei Techniken ausgearbeitet:

- 1) Kultivierung von Muskelzellen zum Studium der Synapsenbildung mit Nervenzellen;
- 2) eine radioimmunologische Bestimmungsmethode für Enkephaline, im Gehirn gefundene Pentapeptide, die wahrscheinlich die endogenen Liganden der Opiat-Rezeptoren darstellen (278).

Entsprechende Arbeitsvorschriften sind in den Abschnitten 3.3.3.2, 3.3.3.3 und 3.5 angegeben. Eine Eichkurve für die Enkephalin-Bestimmung zeigt Abb. 21.

Obwohl die Titer der Enkephalin-Antikörper zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit noch recht niedrig und die Sensitivität der radioimmunologischen Bestimmung von Enkephalin noch nicht zufriedenstellend war, (Nachweisgrenze ca. 1 pMol) sei kurz auf einige vorläufige Ergebnisse hingewiesen:

- 1) Die Antikörper eines der immunisierten Kaninchen binden Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin mit nahezu gleicher Effizienz. Damit ist die Bestimmung beider Enkephaline möglich;
- 2) α -, β - und γ -Endorphin (opiatähnlich wirkende Peptide, die die Met-Enkephalinsequenz als aminoternale Teilsequenz enthalten und selbst Teilsequenzen des β -Lipotropen Hormons (Aminosäuren 61-76, 61-91 bzw. 61-77) darstellen (278)) sowie Morphin beeinflussen nicht die Bindung von Enkephalin. Diese Substanzen können also mit dem Test nicht bestimmt werden.

- 3) Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen enthalten kein Material, das mit der Bindung von radioaktivem Enkephalin an den Antikörper interferiert. Damit kann neuronales Enkephalin in Kokulturen spezifisch gemessen werden.
- 4) Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen scheinen einen Faktor zu produzieren, der die Bindung von radioaktivem Enkephalin an die Antikörper beeinträchtigt. Falls weitere Versuche ergeben sollten, daß es sich bei diesem Material tatsächlich um Enkephalin handelt, so könnte die Enkephalin-Biosynthese an dieser klonalen Zell-Linie untersucht werden.

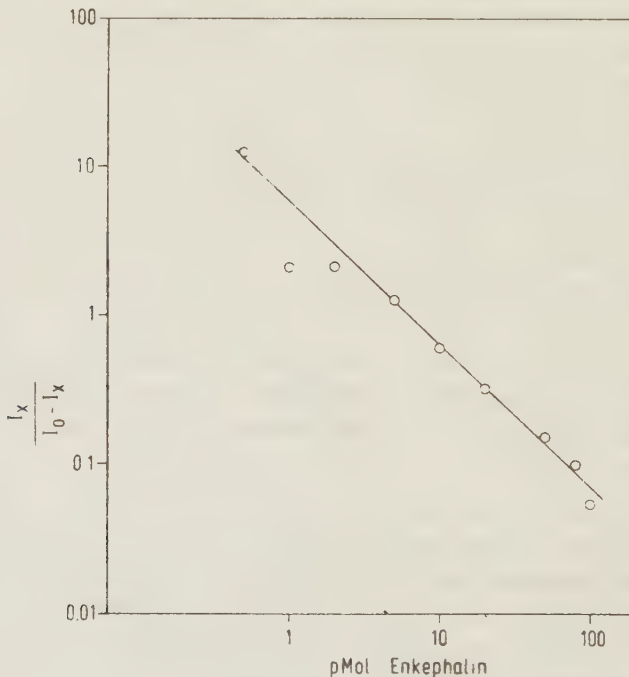


Abb. 21 Eichkurve zur radioimmunologischen Bestimmung von Enkephalin. Antiserum-Verdünnung 1:200. Die Werte I_x und I_0 sind analog den in Abschnitt 2.1.2.1 für die cGMP-Bestimmung definierten.

2.6 Untersuchungen zur Entwicklung einer Methode der rezeptor-spezifischen Anreicherung von Zellen

Zur Auftrennung von Zellgemischen in einheitliche Subpopulationen kann man sich prinzipiell sämtliche Unterschiede zwischen den zu trennenden Zelltypen zu Nutze machen wie etwa Größe, Dichte, Oberflächenladung, Oberflächenantigene sowie die unterschiedliche Abhängigkeit verschiedener Subpopulationen von der chemischen Zusammensetzung des Wachstumsmediums. So konnten Zelltrennungen erzielt werden durch:

- 1) Dichtegradientenzentrifugation,
- 2) Geschwindigkeitssedimentation,
- 3) Trägerfreie Zell-Elektrophorese,
- 4) Affinitäts-"Chromatographie",
- 5) Rosettenbildung mit Erythrocyten,
- 6) spezifische Komplement-Lyse durch Antikörper gegen Oberflächenantigene,
- 7) Verwendung selektiver Medien.

Derartige Verfahren waren bislang vor allem bei der Auftrennung von Zellen des Immunsystems erfolgreich (Übersichtsrartikel: (3)).

Die Anwendung dieser Methoden auf das hochkomplexe Zellgemisch des adulten Gehirns ist wegen dessen fester, eng vernetzter Struktur, die ohne schwere Schädigung der Zellen nicht aufzubrechen ist, bislang nicht gelungen. Dagegen lassen sich aus unreifem Gehirn leicht Suspensionen lebensfähiger Zellen herstellen. Die Verwendung von Primärkulturen dieser Zellen als Ausgangsmaterial zur Anreicherung einheitlicher Subpopulationen hat einige Vorteile:

- 1) Eine Kultivierung unter speziellen Bedingungen bedeutet einen ersten Anreicherungsschritt; so können z.B. nicht-neuronale Zellen selektiv kultiviert werden.

- 2) Die Mischpopulation kann vor der weiteren Anreicherung charakterisiert werden; gewisse Zelltypen lassen sich durch einen Satz von Eigenschaften kennzeichnen (vgl. Abschnitt 2.2.4).
- 3) Die Gewinnung lebensfähiger Einzelzellen aus Primärkulturen ist wesentlich leichter als aus adultem Gehirn.

Die Anreicherung von Zellpopulationen, die durch eine bestimmte Kombination von Luxusfunktionen gekennzeichnet sind, etwa einen Satz von Hormonrezeptoren, ist optimal zu verwirklichen durch eine Methode, die eine Fraktionierung nach funktionellen Kriterien erlaubt. Ein Beispiel eines solchen Verfahrens ist die erwähnte Affinitäts-"Chromatographie" von Zellen:

Moleküle, die an bestimmte Strukturen auf der Zelloberfläche binden (z.B. Antikörper gegen Oberflächenantigene), werden an eine feste Matrix (Glas, Polyacrylamid, Dextran, Nylon usw.) gekoppelt. Zellen, die die entsprechenden Oberflächenstrukturen aufweisen, bleiben an dem derivatisierten Material haften und können so von den ungebundenen Zellen abgetrennt werden. Analog könnte auch die Hormon-Rezeptor-Interaktion zur Bindung von Zellen ausgenützt werden. Tatsächlich ist eine Fixierung von verschiedenen Zelltypen an immobilisierte Hormone beschrieben worden (279-281). Zu Beginn dieser Arbeit durchgeführte Versuche zur Bindung von Ratten-Gliomazellen über ihren β -adrenergen Rezeptor an ein Sepharose- oder Nylonfaser-gekoppeltes BSA - Noradrenalin Addukt verliefen erfolglos (zur Versuchsdurchführung vgl. Abschnitt 3.6). Auch entsprechende Versuche zur Kopplung von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen über ihren AcCh-Rezeptor schlugen fehl (282). Gründe dieser Mißerfolge könnten sein:

- 1) Zu geringe Stabilität der Hormon-Rezeptor Bindung,
- 2) keine oder stark eingeschränkte Wechselwirkung zwischen Rezeptor und immobilisiertem Hormon (chemische und sterische Veränderung des Hormons).

2.6.1 Die Verwendung spezifischer Antikörper zur Anreicherung von Zellen.

Nach den erfolglosen Versuchen zur Fixierung von Zellen an immobilisierte Hormone stellte sich die Frage, ob nicht Möglichkeiten gefunden werden können, auch zur Affinitäts-"Chromatographie" von Zellen des Nervensystems die vergleichsweise viel stabilere Antigen-Antikörper Interaktion nutzbar zu machen. Das Problem dabei ist, daß die antigenen Determinanten auf Zellen des Nervensystems kaum bekannt sind. Einige spezifische Antigene des Nervensystems konnten zwar serologisch charakterisiert werden (146, 283-285), ihre Zuordnung zu bestimmten Zelltypen ist jedoch erst in den Anfängen (286).

Optimal wäre die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper gegen Hormonrezeptoren. Bisher stehen aber nur Antiseren gegen den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor zur Verfügung (287), da sich die Reinigung anderer Rezeptoren als sehr schwierig erwies. Allerdings könnten Antiseren gegen die Oberflächenantigene einer ganzen Zelle auch Antikörper gegen die vorhandenen Hormonrezeptoren enthalten. Dies sollte an einer antagonistischen Wirkung des Antiserums auf die durch das entsprechende Hormon induzierten Effekte zu erkennen sein. Derartige antagonistische Wirkungen eines Antiserums gegen Zellen, die Dopamin-Rezeptoren haben, auf Dopamin-Effekte wurden inzwischen beschrieben (288).

Ein empfindlicher biologischer Test auf die Anwesenheit eines gegen einen Hormonrezeptor gerichteten Antikörpers sollte in einer Verhinderung der hormonellen Steigerung der cAMP-Spiegel gegeben sein. Dies setzt allerdings voraus, daß ein derartiger Effekt von der Wirkung der vielen unbekannten im Serum vorhandenen Faktoren unterschieden werden kann. Daher wurde zunächst die Wirkung von Normalseren auf die intrazellulären cAMP-Spiegel untersucht.

2.6.2 Der Einfluß von Normalseren auf den intrazellulären Gehalt an cyclischen Nukleotiden in Zellkulturen.

Frisches Kaninchenserum verhindert die Stimulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation durch NA in C6-BU-1-Gliomazellen (Abb. 22 A, B, Kurve I). Dagegen werden weder die Basis-Werte von cAMP noch die von cGMP signifikant beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Einen analogen Effekt haben auch die Seren von Ratte, Meerschweinchen, Huhn, Pferd (Daten nicht gezeigt) sowie foetales Kalbsserum (vgl. Abschnitt 2.6.2.4). Dialyse des Serums bei 4°C führt zu einer leichten Verkleinerung des Effektes (Abb. 22 A, Kurve II). Dies kann aber nicht als Hinweis auf einen aktiven, niedermolekularen Faktor gewertet werden, da das entsprechende Dialysat (eingesetzt in einer der jeweiligen Serum-Konzentration entsprechenden Menge) keinen Effekt aufweist (Abb. 22 A, Kurve IV) und ein gleicher Verlust an Aktivität auch bei einer nicht dialysierten Serumkontrolle beobachtet wird, die die gleiche Zeit bei 4°C inkubiert wurde (Abb. 22 A, Kurve III). Wird das Serum für 30 min bei 56°C inkubiert, (Inaktivierung des Komplements), tritt der gleiche Aktivitätsverlust auf (Abb. 22 B, Kurve II).

Eine für die späteren Tests von Antiseren wichtige Frage ist, ob der hemmende Effekt von Normalseren auf die hormonelle Steigerung der cAMP-Spiegel reversibel ist. Ein entsprechender Effekt eines den Rezeptor blockierenden Antikörpers sollte irreversibel sein. Die Zellen wurden daher mit verschiedenen Konzentrationen an Normalserum in Inkubationsmedium vorinkubiert (10 min 37°C, CO₂ Inkubator), dann das Serum gewaschen (2 x 2 ml) und anschließend unter den üblichen Bedingungen (Abschnitt 3.4.3) mit NA stimuliert. Abb. 22 B, Kurve III, zeigt, daß unter diesen Bedingungen die Steigerung der cAMP-Spiegel durch NA nicht mehr beeinflusst wird, der Hemmeffekt des Serums also reversibel ist.

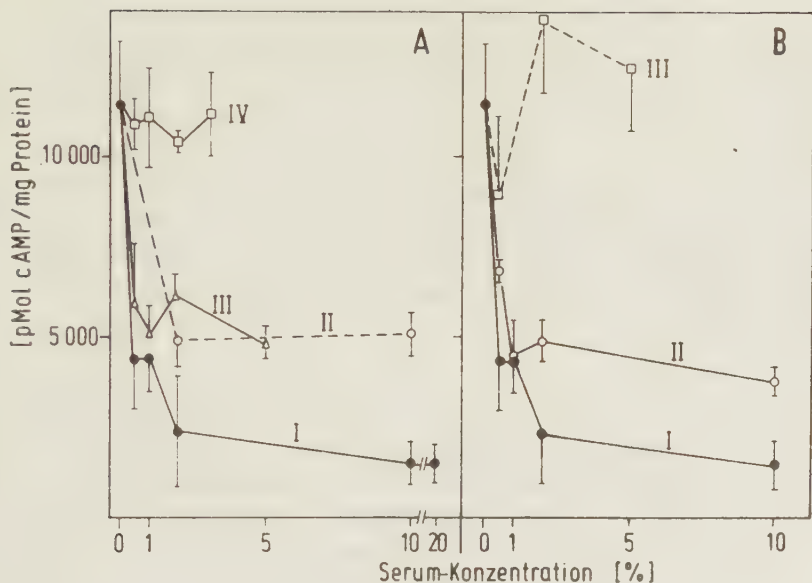


Abb. 22 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Bildung durch Kaninchenserum in C6-BU-1-Gliomazellen. A, B, Kurve I: frisches Serum; Kurve A II: Serum nach 3 Tagen bei 4°C; Kurve A III: Serum nach 3 Tagen Dialyse gegen DMEM bei 4°C; Kurve A IV: Dialysat entsprechend zu Kurve III; Kurve B II: Serum 30 min bei 56°C inaktiviert; Kurve B III: Vorinkubation mit frischem Serum für 10 min, waschen, Inkubation mit NA 10 min. C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 32, 2.8×10^7 lebende Zellen und 3 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit >99%.

Der Serum-Effekt ist weder hormon- noch zellspezifisch. Neben der Erhöhung der cAMP-Spiegel in Ratten-Gliomazellen durch NA (Abb. 22 A, B, Kurve I) wird auch der entsprechende Effekt von PGE_1 auf diese Zellen (Tab. 28, Exp. 1) sowie auf Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (Abb. 23) durch Normalserum gehemmt. Gleiches gilt für die β -adrenerg gesteuerten cAMP-Spiegel in Primärkulturen (Tab. 28, Exp. 2).

Eine bei 18% Na_2SO_4 ausgefällte γ -Globulin-Fraktion (vgl. Abschnitt 3.8) besaß ebenfalls inhibitorische Aktivität (Daten nicht gezeigt). Fällung mit 5% TCA führte zu irreversibler Inaktivierung (Daten nicht gezeigt).

Einige weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des aktiven Faktors in Normalserum sind in den folgenden Abschnitten beschrieben. Alle bei diesen Experimenten verwendeten Seren wurden zur Inaktivierung des Komplements 30 min bei 56°C inkubiert.

Tab. 23 Hemmung der Iprot- und PGE_1 -Effekte an nicht-neuronalen Hirnzellen bzw. C6-BU-1-Gliomazellen durch Kaninchenserum (30 min bei 56°C inaktiviert).
Exp. 1: C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 24, 8×10^6 Zellen und 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit $>99\%$. Exp. 2: Primärkulturen aus perinatalen Mäusen, 24 Tage in Kultur, 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser).

Zusatz (Konzentration)		(pMol cAMP/mg Protein)
Exp. 1	Kontrolle	$17^{\pm} 1$
	PGE_1 (10 μM)	$177^{\pm} 11$
	PGE_1 + Serum (1%)	$103^{\pm} 5$
	PGE_1 + Serum (2.5%)	$76^{\pm} 6$
	PGE_1 + Serum (10%)	$53^{\pm} 4$
Exp. 2	Kontrolle	$2^{\pm} 1$
	Iprot (0.1 μM)	$230^{\pm} 20$
	Iprot + Serum (0.25%)	$130^{\pm} 20$
	Iprot + Serum (10%)	$130^{\pm} 10$

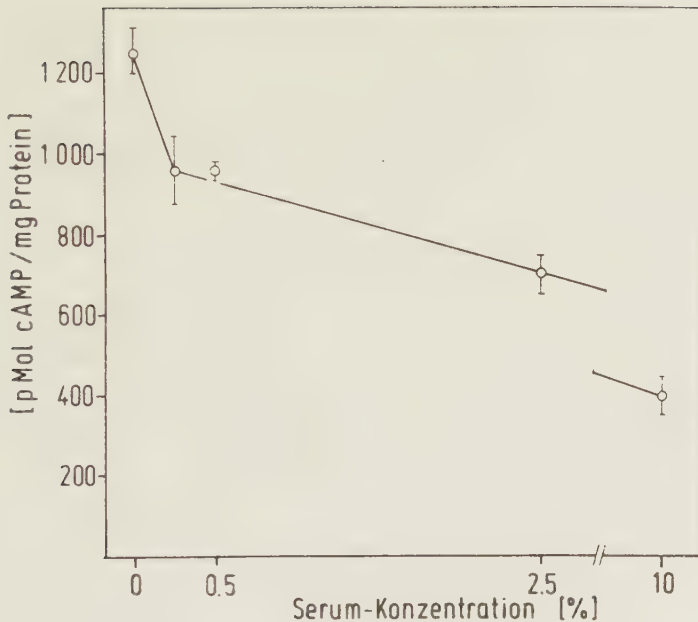


Abb. 23 Kaninchenserum (30 min bei 56°C inaktiviert) hemmt die durch PGE₁ (0.1 uM) stimulierte cAMP-Bildung in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen. Klon 108CC15, Passage 15, 2 x 10⁶ lebende Zellen und 1.1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit 98%.

2.6.2.1 Zeitabhängigkeit des Serum-Effektes

Abb. 24 zeigt den Einfluß verschiedener Serum-Konzentrationen auf den Zeitverlauf der cAMP-Akkumulation bei C6-BU-1-Glioma-zellen. Der hemmende Effekt aller Serum-Konzentrationen ist schon nach 1 min voll ausgeprägt. Wird das Serum 10 min nach Start der Inkubation mit NA zugesetzt, so ist ein rascher Abfall der cAMP-Spiegel zu beobachten (Abb. 25, Kurve II). Die bei längerer Inkubation mit NA eintretende Desensitisierung

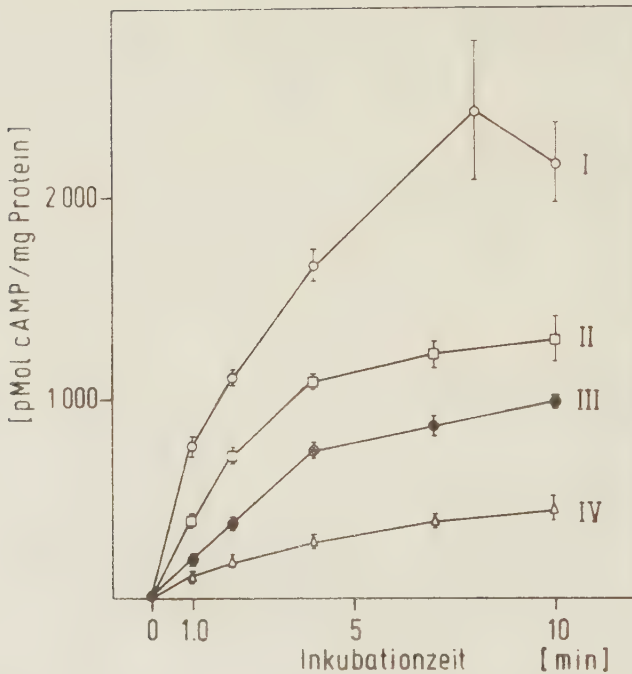


Abb. 24 Stimulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation durch NA (0.1 mM) nach verschiedenen Inkubationszeiten in Abwesenheit (Kurve I) und in Anwesenheit von 0.25% (Kurve II), 1% (Kurve III) und 5% (Kurve IV) Kaninchenserum. Wechsel von Wachstums- auf Inkubationsmedium 3 h vor dem Versuch. C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 25, 2.3×10^7 lebende Zellen und 2.2 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit > 99%.

(34) der Zellen (Abb. 25, Kurve I) wird durch die Anwesenheit von Serum nicht verhindert (Abb. 25, Kurve II).

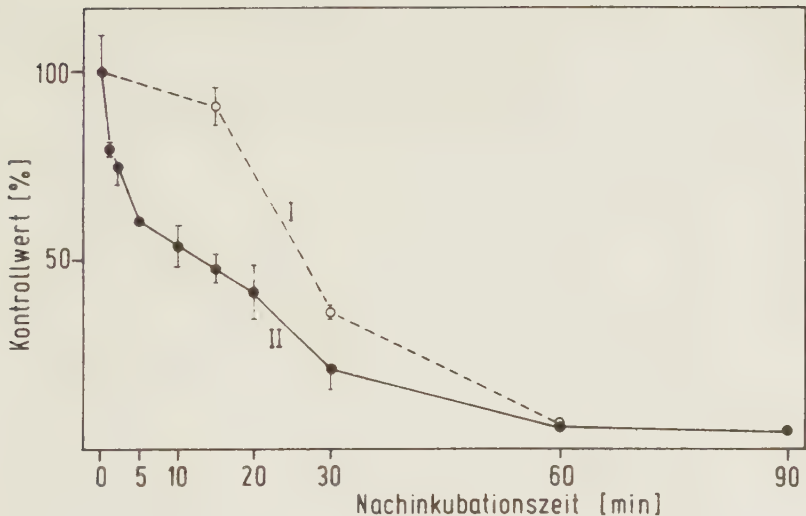


Abb. 25 Effekt von Serum-Zugabe auf erhöhte cAMP-Spiegel. Die Zellen wurden 10 min mit 0.1 mM NA vorstimuliert und nach Zugabe von Kaninchenserum (Endkonzentration 5%) (Kurve II) bzw. H₂O (Kurve I) für die angegebenen Zeiten weiterinkubiert. Die Abb. vereinigt Ergebnisse zweier Experimente (Exp. 1: bis 30 min Nachinkubation, Exp. 2: 30-90 min Nachinkubation). Die nach 30 min Inkubation in beiden Exp. erhaltenen Werte waren identisch. Stimulierte Werte nach 10 min Inkubation mit NA ohne Serum (pMol cAMP/mg Protein) (Kontrollwert = 100%): Exp. 1: 2500 ± 30, Exp. 2: 2590 ± 80, Basiswerte: 7 ± 1 (Exp. 1), 20 ± 2 (Exp. 2). C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 22 (Exp. 1) bzw. 33 (Exp. 2), 2.3 x 10⁷ (Exp. 1) bzw. 2.6 x 10⁷ (Exp. 2) lebende Zellen und 2.3 mg (Exp. 1) bzw. 2.5 mg (Exp. 2) Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit > 99%.

2.6.2.2 Der inhibitorische Effekt des Serums ist nicht kompetitiv.

Die Abb. 26 und 27 zeigen Dosis-Wirkungskurven für die Effekte von PGE_1 auf Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen bzw. von NA auf C6-BU-1-Gliomazellen in Abwesenheit (Kurve I) und Anwesenheit (Kurve II) von Normalserum. In beiden Fällen wirkt

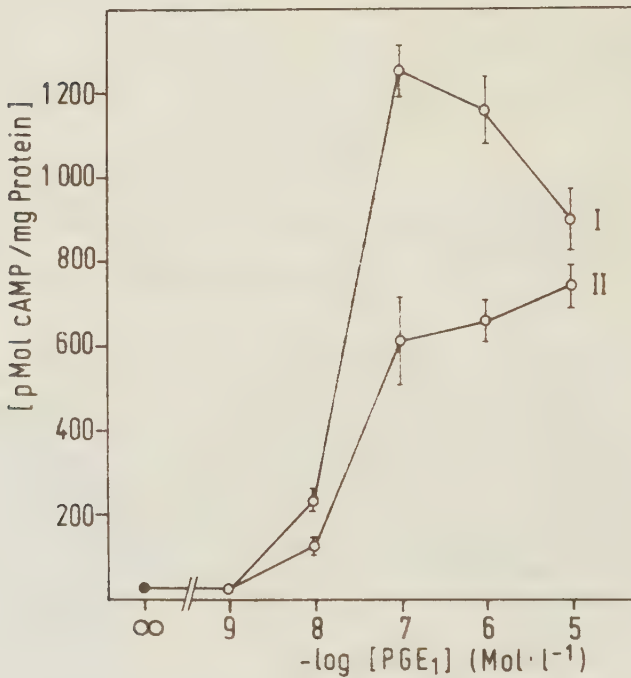


Abb. 26 Hemmung der PGE_1 -stimulierten cAMP-Bildung in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen durch Kaninchen-serum: Erhöhung der PGE_1 -Konzentration wirkt dem Hemmeffekt nicht entgegen. Kurve I: PGE_1 ohne Serum, Kurve II: PGE_1 + 2,5% Serum. Hybride Klon 108CC15, Passage 15, 2×10^6 lebende Zelle und 1.1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit 98%.

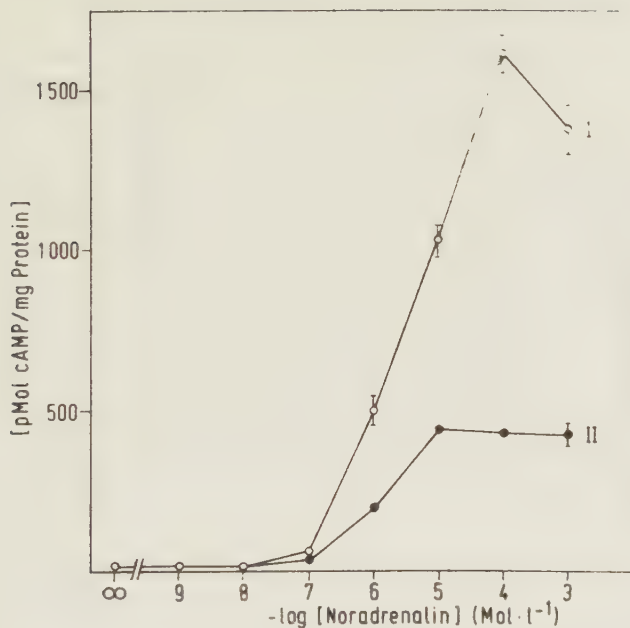


Abb. 27 Hemmung der NA-stimulierten cAMP-Akkumulation durch Kaninchenserum: Erhöhung der NA-Konzentration wirkt dem Hemmeffekt nicht entgegen. Kurve I: NA ohne Serum, Kurve II: NA + 2.5% Serum. C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 29, 1.2×10^7 Zellen und 1.3 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit > 99%.

eine Erhöhung der Konzentration des Agonisten dem Hemmeffekt des Serums nicht entgegen. Dies läßt darauf schließen, daß die inhibitorische Wirkung des Serums nicht auf einer Kompetition am Hormonrezeptor beruht.

2.6.2.3 Der wirksame Faktor im Normalserum ist hitzestabil und säure- und alkaliresistent.

Inkubation von verdünntem Serum im kochenden Wasserbad hat, wenn überhaupt, nur einen sehr geringen Einfluß auf seine inhibitorische Aktivität. Abb. 28 zeigt die nach verschiedenen langer Hitzebehandlung erhaltenen Hemmeffekte auf die durch NA gesteigerten cAMP-Spiegel in C6-BU-1-Gliomazellen. Auch längere Hitzebehandlung bis zu 30 min veränderte die Aktivität nicht wesentlich (Daten nicht gezeigt). Aus dem nach Erhitzen von unverdünntem Serum entstehenden vernetzten Proteingel kann die wirksame Aktivität dagegen auch durch Homogenisieren (Potter-Elvehjem) nicht wieder extrahiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch nach Hitzebehandlung des verdünnten Serums ist die wirksame Aktivität nicht dialysierbar (Daten nicht gezeigt).

Einstündige Inkubation bei pH 1.0 und pH 12.0 (HCl bzw. NaOH) bei Zimmertemperatur hat nur einen geringen Einfluß auf die inhibitorische Aktivität (Abb. 29).

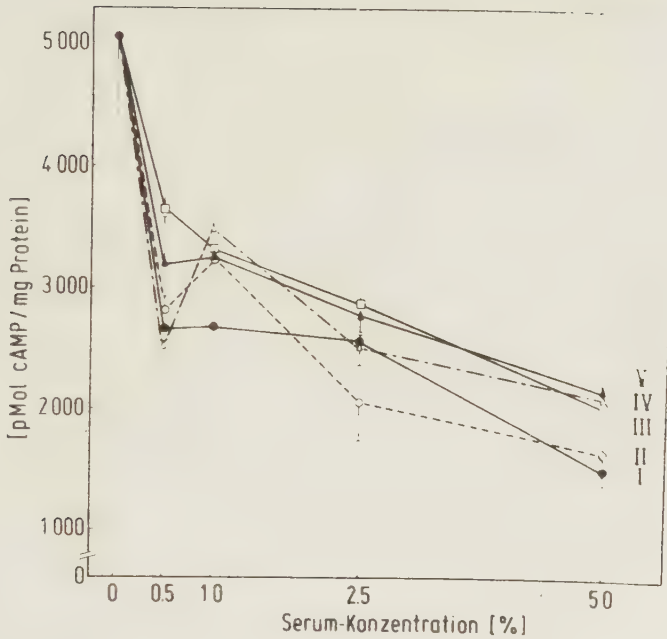


Abb. 28 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Akkumulation durch Kaninchenserum: der wirksame Faktor ist hitzeresistent. 1:10 in Inkubationsmedium verdünntes Serum wurde nicht erhitzt (Kurve I) oder für 1 min (Kurve II), 2 min (Kurve IV), 5 min (Kurve III), 10 min (Kurve V) bei 100°C inkubiert. C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 25, 2×10^7 Zellen und 2 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit >99%.

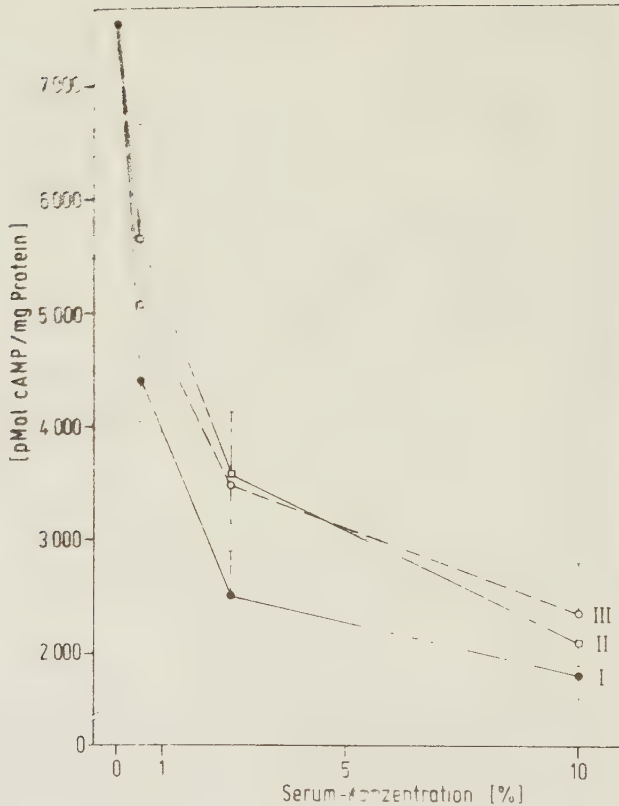


Abb. 29 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Akkumulation durch Kaninchenserum: Einfluß von Säure- und Alkalibehandlung bei Zimmertemperatur. Kurve I: Kontrolle, Kurve II: 1 h bei pH 1.0 (HCl), Kurve III: 1 h bei pH 12.0 (NaOH). C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 24, 1.4×10^7 Zellen und 1.9 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit >99%.

2.6.2.4 Der wirksame Faktor adsorbiert an Holzkohle; Vergleich der Hemmeffekte verschiedener foetaler Kalbsseren; Entfernung von Lipiden oder Lipoproteinen hat keinen Einfluß auf die inhibitorische Aktivität.

Wenn dem Wachstumsmedium von Neuroblastomazellen an Stelle des normalen foetalen Kalbsserums ein Serum zugesetzt wird, dessen Lipide durch Extraktion mit Holzkohle oder organischen Lösungsmitteln entfernt worden sind, so beobachtet man morphologische Differenzierung der Zellen. Verschiedene kommerziell vertriebene foetale Kalbsseren zeigen in dieser Hinsicht sehr unterschiedliche Aktivität (289). Ähnliche differenzierende Einflüsse wurden von lipoprotein-freiem Serum berichtet (290). Da eine Behandlung mit Agentien, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, sowie mit Dibutyryl-cAMP ebenfalls zur morphologischen Differenzierung der Zellen führt, (24, 25), könnte man vermuten, daß Lipide oder Lipoproteine für den in dieser Arbeit beschriebenen hemmenden Effekt von Serum auf die Steigerung der cAMP-Spiegel verantwortlich sind.

Wie Serum von adulten Kaninchen (Abb. 30, Kurve I) wirken auch kommerziell bezogene foetale Kalbsseren (Kurve II: GIBCO, Kurve III: Colorado Serum Co.) der Steigerung der cAMP-Spiegel durch NA (0.1 mM) in Ratten-Gliomazellen entgegen. Die beiden foetalen Kalbsseren, deren Einfluß auf die morphologische Differenzierung von Neuroblastoma-Zellen sehr verschieden ist (289), sind in der Absenkung der cAMP-Spiegel gleich aktiv (Abb. 30, Kurven II und III), aber von etwas geringerer Effektivität als Kaninchenserum (Abb. 30, Kurve I). Dagegen ist Colorado-Serum nach Extraktion mit Holzkohle (291) (zur Verfügung gestellt von Denis Monard, Friedrich Miescher Institut, Basel), ohne jede inhibitorische Aktivität (Abb. 30, Kurve IV).

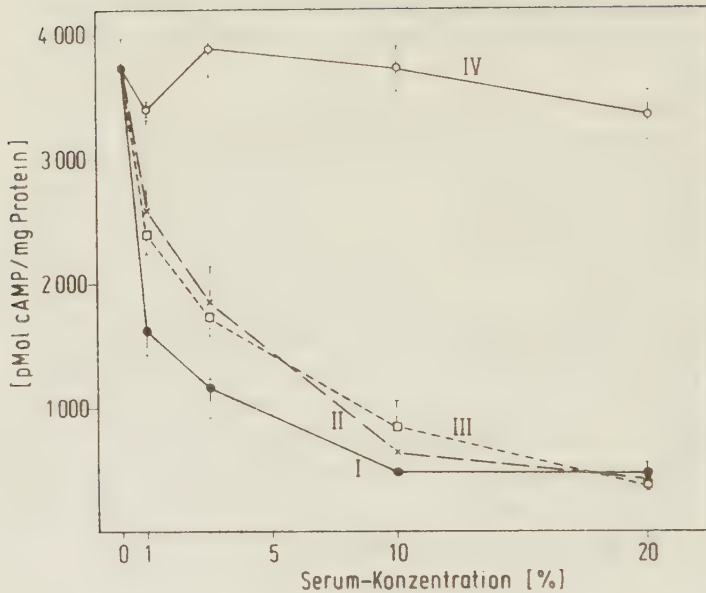


Abb. 30 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Akkumulation durch Kaninchenserum (Kurve I) und foetales Kalbsserum von GIBCO (Kurve II) bzw. Colorado-Serum Co. (Kurve III). Einfluß von Holzkohle-Adsorption auf die Aktivität von Colorado-Serum (Kurve IV). C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 25, 9×10^6 lebende Zelle und 1.3 mg Protein pro Platte, (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit > 99%.

Abtrennung der β -Lipoproteine aus foetalem Kalbsserum (GIBCO) führte zu einer Präparation, die die morphologische Differenzierung von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen in Gegenwart von Dibutyryl-cAMP deutlich verstärkte (292). Diese Präparation unterschied sich in ihrer inhibitorischen Aktivität auf die cAMP-Spiegel (Abb. 31, Kurve II) jedoch nicht signifikant von unbehandeltem Serum (Abb. 31, Kurve I). Die wieder solubilisierten β -Lipoproteine (Abb. 31, Kurve III)

hatten keinen Effekt. Kaninchenserum, dessen Lipide durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (293) entfernt wurden (Abb. 32, Kurve II), hat praktisch die gleiche Hemmwirkung wie unbehandeltes Serum (Abb. 32, Kurve I).

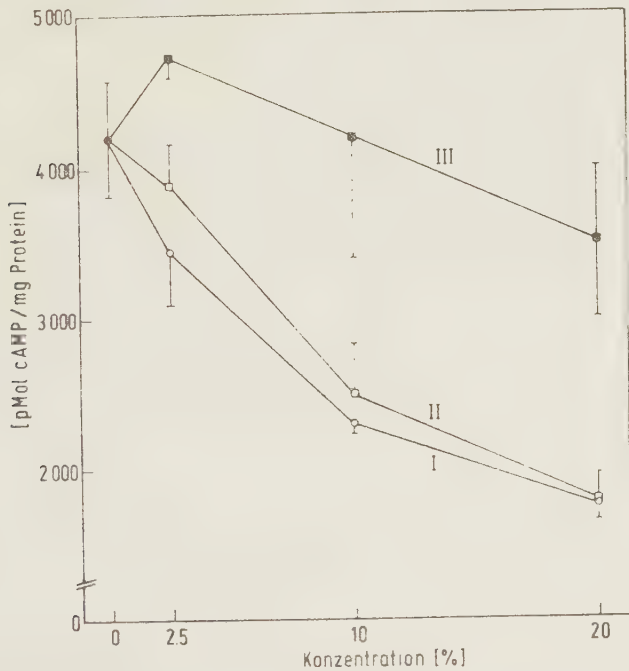


Abb. 31 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Akkumulation durch foetales Kalbsserum: Effekte von β -lipoprotein-freiem Serum und der extrahierten β -Lipoproteine. Kurve I: foetales Kalbsserum (Seromed); Kurve II: foetales Kalbsserum (Seromed) ohne β -Lipoproteine; Kurve III: β -Lipoproteine aus foetalem Kalbsserum in PBS (in gleicher Konzentration wie im Serum). C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 23, 2.8×10^7 Zellen und 3mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit >99%.

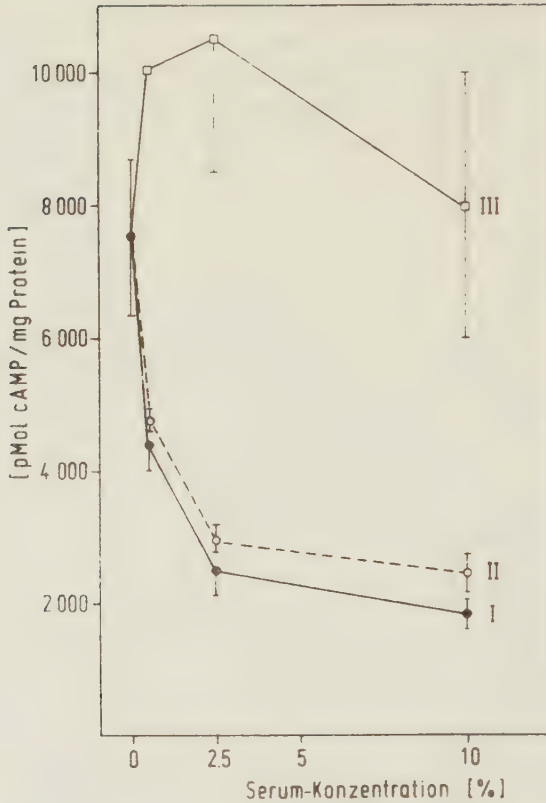


Abb. 32 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Akkumulation durch Kaninchenserum: Extraktion der Lipide mit org. Lösungsmitteln hat keinen Einfluß auf die inhibitorische Aktivität. Kurve I: Kontrolle; Kurve II: Extrahiertes Serum; Kurve III: Extrakt gelöst in Äthanol. C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 24, 1.4×10^7 lebende Zellen und 1.9 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser). Lebensfähigkeit >99%.

Die in Alkohol gelösten, extrahierten Lipide in entsprechender Konzentration wie im Serum haben keinen signifikanten Effekt (Abb. 32, Kurve III).

2.6.2.5 Einfluß verschiedener Enzyme auf die inhibitorische Aktivität im Serum.

Inkubation von 1:10 verdünntem und 5 min bei 100°C erhitztem Kaninchenserum mit 1 mg/ml Pronase bei 37°C für 2.5 h beeinflusst die inhibitorische Aktivität des Serums, wenn überhaupt, nur unwesentlich (Abb. 33, Kurve II, gleichbehandelte Kontrolle ohne Pronase-Zusatz: Kurve I).

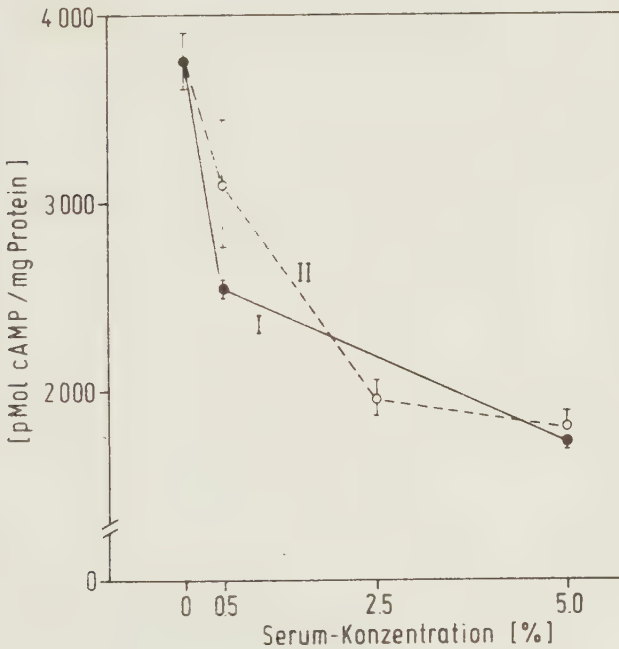


Abb. 33 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Akkumulation durch erhitztes (5 min, 100°C) und anschließend pronase-behandeltes (2.5 h, 37°C, 1 mg/ml in Inkubationsmedium) Serum (Kurve II); gleichbehandelte Kontrolle ohne Enzym (Kurve I). C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 25, 0.9×10^6 Zellen und 1.3 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit >99%.

Inkubation mit Ribonuclease (1 mg/ml 30 min, 37°C) änderte in einem Versuch ebenfalls die Hemmwirkung nicht signifikant (Abb. 34, Kurve II), im Vergleich zur gleichbehandelten Kontrolle ohne Enzym (Abb. 34, Kurve I). Dagegen bewirkten Phosphodiesterase (aus Rinderherz, Hydrolyse cyclischer Nukleotide) (Abb. 34, Kurve III) sowie alkalische Phosphatase (*E. coli*) (Abb. 34, Kurve IV) im gleichen Versuch jeweils eine partielle Inaktivierung.

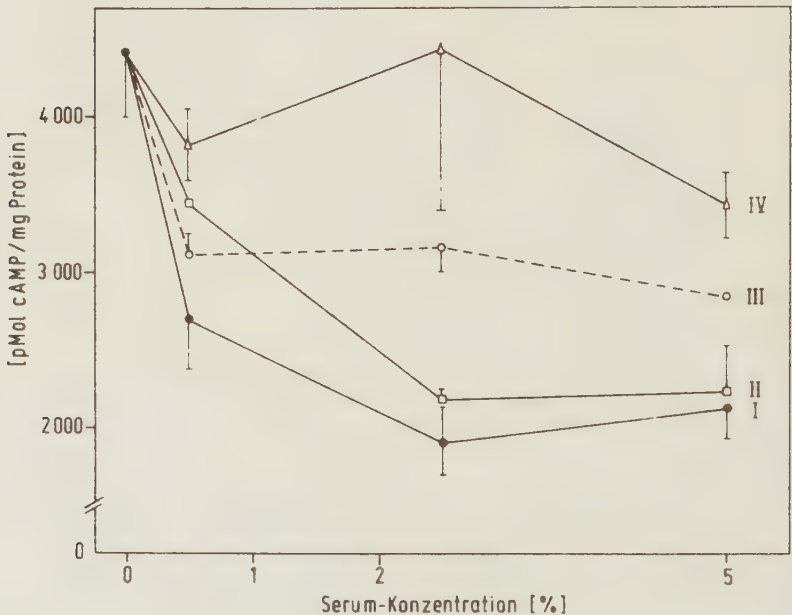


Abb. 34 Hemmung der durch 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Akkumulation durch erhitztes Serum (15 min, 100°C): Einfluß verschiedener Enzyme (30 min, 37°C) auf die inhibitorische Aktivität. Kurve I: Kontrolle; Kurve II: Ribonuclease (1 mg/ml); Kurve III: Phosphodiesterase (Rinderherz) 100 ug/ml; Kurve IV: alkalische Phosphatase (*E. coli*), 10 ug/ml. C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 24, 0.9×10^7 lebende Zellen und 1.2 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit > 99%.

2.6.2.6 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Seren von adulten und foetalen Tieren einen oder mehrere Faktoren enthalten, die der Erhöhung der cAMP-Spiegel in kultivierten Zellen durch β -adrenerge Agonisten und PGE_1 entgegenwirken. Dieser Effekt ist weder zelltyp- noch hormonspezifisch und durch Erhöhung der Hormonkonzentration nicht rückgängig zu machen. Daher ist eine kompetitive Wirkung am Hormonrezeptor ausgeschlossen. Der inhibitorische Effekt ist reversibel: Nach Wegwaschen des Serums sind die Zellen wieder voll stimulierbar. Damit kann die Wirkung von Normalserum von einem eventuellen Effekt eines Antiserums gegen Oberflächenantigene unterschieden werden. Daher wurde die Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität von Normalseren in dieser Arbeit zunächst auf einige wenige, vorläufige Untersuchungen beschränkt. Experimente, die ein klareres Bild über die chemische Natur des wirksamen Faktors (oder der Faktoren) liefern könnten, sind geplant.

Die Untersuchung von Serum-Effekten auf die morphologische Differenzierung von Zellen, bei denen man eine Vermittlung über die cAMP-Spiegel vermuten könnte, lieferte widersprüchliche Resultate: Die durch β -adrenerge Stimulierung von Ratten-Gliomazellen induzierte morphologische Differenzierung wird durch Seren verschiedener Spezies verhindert. Diese Aktivität ist labil gegen Hitze- Säure- und Trypsinbehandlung aber resistent gegenüber Lipidlösungsmitteln (294). Dagegen wird eine durch lipid-freies foetales Kalbsserum induzierte morphologische Differenzierung von Neuroblastomazellen durch Zusatz von Fettsäuren verhindert (289). Die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte inhibitorische Aktivität auf die Steigerung der cAMP-Spiegel ist dagegen stabil gegen Hitze- Säure- und Pronase-Behandlung und resistent gegen Extraktion mit organischen Lösungsmitteln.

Allerdings scheint noch eine zweite Aktivität im Serum vorhanden zu sein, die schon bei der Inaktivierung des Komplexes (30 min, 56°C) (partiell?) verloren geht. Diese Aktivität könnte eventuell mit dem kürzlich erwähnten (Abstract: 295) hitzelabilen, mit Ammonsulfat fällbaren und die cAMP-Akkumulation hemmenden Serum-Faktor identisch sein. Aber auch die hitze-stabile Aktivität könnte noch auf der Anwesenheit mehrerer Faktoren beruhen. Als Hinweis darauf könnte man die partielle Inaktivierung sowohl durch alkalische Phosphatase als auch durch (cyclische Nukleotide hydrolysierende) Phosphodiesterase werten. Serum scheint demnach eine Reihe von Faktoren zu enthalten, die die morphologische Differenzierung und/oder die Steigerung der cAMP-Spiegel von kultivierten Zellen beeinflussen.

2.6.3 Versuche zur Gewinnung von Antiseren gegen Hormonrezeptoren.

Nachdem geklärt war, daß die Wirkung von Normalseren auf die Erhöhung der cAMP-Spiegel wegen der Reversibilität des Effektes keine Störung des Testes auf rezeptor-spezifische Antikörper darstellt, bedarf noch eine weitere Frage der Prüfung: Führt vielleicht die Bindung von Antikörpern an Oberflächenantigene grundsätzlich zur Hemmung der Stimulierbarkeit durch Hormone, auch ohne daß der entsprechende Rezeptor durch einen Antikörper blockiert ist?

Die in Tab. 29 aufgeführten Daten zeigen, daß dies nicht zu befürchten ist. C6-BU-1-Gliomazellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen eines Antiserums gegen diese Zellen in der Kälte für 30 min inkubiert, anschließend das Serum weggewaschen und die Zellen wie üblich mit NA (0.1 mM) stimuliert. Die Bindung der Antikörper an die Zellen wurde in Replika-Platten durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die mit Antiserum vorbehandelten Zellen sind gegen eine

Tab. 29 Bindung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene verhindert nicht die Steigerung der cAMP-Spiegel in Ratten-Gliomazellen. Die Zellen wurden 2x mit kaltem Medium D2 gewaschen, 30 min mit dem Medium D2 verdünnten Serum bei 4°C inkubiert, 2x mit warmem Inkubationsmedium gewaschen und dann wie üblich (Abschnitt 3.4.3) mit NA bzw. H₂O inkubiert (10 min 37°C, CO₂-Inkubator). C6-BU-1-Gliomazellen, Passage 34, 1.8 x 10⁷ lebende Zellen und 3 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit > 99%. Mediumwechsel von Wachstum- auf Inkubationsmedium 3 h vor Versuchsbeginn (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Vorinkubation in (Verdünnung):	Hauptinkub. mit (uM)	cAMP (pMol/mg Protein)	Immun- fluoresz.
-	Kontrolle	7 [±] 1	-
Normalserum (1:5)	Kontrolle	7 [±] 1	-
Antiserum (1:5)	Kontrolle	6 [±] 1	+++
-	NA (10)	3390 [±] 200	-
Puffer-Kontrolle	NA	3410 [±] 300	-
Normalserum (1:100)	NA	4090 [±] 760	-
(1:20)	NA	4150 [±] 210	-
(1:10)	NA	4400 [±] 180	-
(1:5)	NA	5430 [±] 160	-
Antiserum (1:100)	NA	5270 [±] 190	+
(1:20)	NA	4130 [±] 260	+++
(1:10)	NA	4470 [±] 430	+++
(1:5)	NA	4700 [±] 450	+++

Stimulierung mit NA nicht insensitiver als die Zellen, die mit Präimmunsrum in gleicher Konzentration vorinkubiert wurden. Sowohl Normalserum als auch Antiserum scheinen aber eine leichte Steigerung der Sensivität zu bewirken, deren Signifikanz allerdings fraglich ist. Versuche dieser Art können also dazu verwendet werden, Antiseren auf die Gegenwart eines rezeptor-spezifischen Antikörpers zu testen. Entsprechende Untersuchungen an einer Reihe von Antiseren gegen Ratten-Gliomazellen und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen werden zur Zeit durchgeführt.

2.6.4 Untersuchungen zur Realisierung einer "Hapten-Sandwich"-Technik zur spezifischen Bindung von Antikörpern an Hormonrezeptoren.

Für eine Reihe von Rezeptoren stehen inzwischen Antagonisten zur Verfügung, deren Bindung an den Rezeptor irreversibel ist (296-299). Zellen, an deren Rezeptoren solche "Affinitäts-Marker" gebunden sind, weisen daher diese Moleküle als zusätzliche antigene Determinanten auf. Konjugate solcher Affinitäts-Marker mit Proteinen können zur Erzeugung hapten-spezifischer Antikörper verwendet werden. Diese Antikörper sollten dann mit hoher Spezifität nur die durch die Affinitätsmarkierung zusätzlich eingeführten antigenen Determinanten auf der Zelloberfläche erkennen und damit indirekt, über eine "Hapten Sandwich" (300)-Struktur an den Rezeptor binden.

Eine verwandte Technik wurde bereits erfolgreich angewendet zum "Capping" der Oberflächenantigene von Lymphocyten nach (unspezifischer) Derivatisierung mit einem Hapten (300) und zur Messung von membrangebundenen Polypeptidhormonen durch Bindung eines ^{125}I -markierten Antikörpers gegen das Hormon (301).

Eine indirekte Bindung eines Antikörpers an den Rezeptor über eine "Hapten-Sandwich"-Struktur mit einem Affinitätsmarker des Rezeptors hätte gegenüber anderen Verfahren (vgl. Abschnitt 2.6 und 2.6.1) wesentliche Vorteile:

- 1) Die Spezifität des Affinitätsmarkers kann in biologischen Tests geprüft werden. Sterische Hinderung und chemische Veränderung nach Kopplung an eine feste Matrix entfallen;
- 2) der Antikörper kann (etwa durch Affinitätschromatographie) hoch gereinigt werden. Störungen durch verunreinigende Antikörper gegen andere Oberflächenantigene entfallen.

Von besonderem Interesse war nach den Ergebnissen der Charakterisierung von Primärkulturen nicht-neuronaler Hirnzellen (vgl. Abschnitt 2.2) die Anreicherung der α -adrenerg reizbaren Zellen aus diesen Kulturen. Ein zusätzlicher Vorteil ist die Verfügbarkeit auch einer permanenten Zell-Linie (Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen), die einen α -adrenergen Rezeptor besitzt, so daß diese Zellen als Modell für die zu entwickelnde Trennmethode dienen können. Außerdem steht in Phenoxybenzamin bereits ein irreversibler Hemmstoff des α -adrenergen Rezeptors zur Verfügung (182).

Die in Tab. 30 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Zellen nach Vorinkubation mit Phenoxybenzamin gegenüber der Hemmwirkung von NA auf den PGE_1 -Effekt wesentlich weniger sensitiv sind als die Kontrollen. Nach der Vorinkubation wurde das Phenoxybenzamin gewaschen. Die bekannte (182) Irreversibilität der Phenoxybenzamin-Wirkung ist also auch bei diesen Zellen gewährleistet.

Tab. 30 Phenoxybenzamin hemmt den Effekt von NA auf die durch Prostaglandin stimulierte Erhöhung der cAMP-Spiegel in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen. Die Zellen wurden vor der Vorinkubation 1 x und nach der Vorinkubation 2 x mit warmem Inkubationsmedium gewaschen (je 2 ml), Hauptinkubation erfolgte wie üblich (vgl. Abschnitt 3.4.3). Hybride 108CC15, Passage 13, 2.0×10^6 lebende Zellen und 1 mg Protein pro Platte (60 mm Durchmesser), Lebensfähigkeit 92%.

Vorinkubation (10 min) Zusatz (μM)	Hauptinkubation (10 min) Zusatz (μM)	cAMP (pMol/mg Protein)
Alkohol - Kontrolle ^{a)}	Alkohol - Kontrolle ^{a)}	$10^{\pm} 2$
Alkohol - Kontrolle ^{a)}	PGE_1 (1)	$970^{\pm} 110$
Alkohol - Kontrolle ^{a)}	PGE_1 + NA (10)	$28^{\pm} 6$
Phenoxybenzamin (0.01)	PGE_1 + NA	$31^{\pm} 11$
Phenoxybenzamin (0.1)	PGE_1 + NA	$130^{\pm} 70$
Phenoxybenzamin (1)	PGE_1 + NA	$670^{\pm} 40$

^{a)} siehe Abschnitt 3.4.3, S. 144

Zur Gewinnung eines antigenen Phenoxybenzamin-Protein-Konjugates wurde Kaninchenserumalbumin durch Umsetzung mit S-Acetylmercaptobornsteinsäureanhydrid und alkalische Abspaltung des Acetylrestes in eine SH-gruppenreiche Form überführt (302) und diese mit Phenoxybenzamin derivatisiert. Abb. 35 zeigt die einzelnen Reaktionsschritte der Kopplung. Als β -Chlor-Alkylamin reagiert Phenoxybenzamin über eine Aziridin-Struktur mit nukleophilen Gruppen.

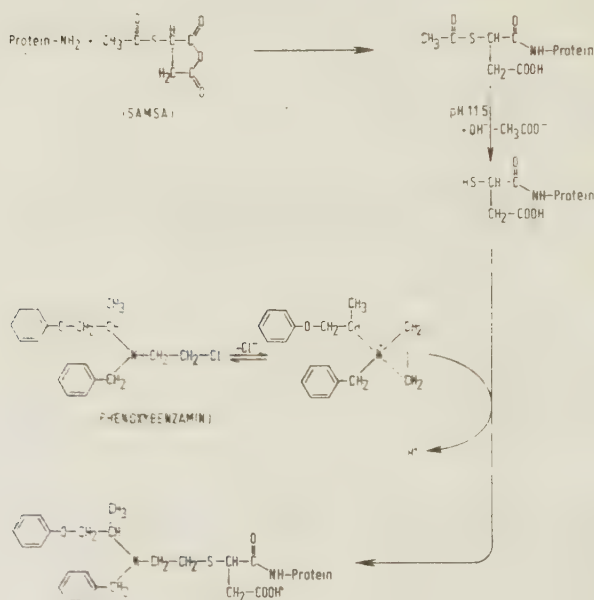


Abb. 35 Kopplung von Phenoxybenzamin an Serumalbumin über zusätzlich eingeführte SH-Gruppen.

Das Konjugat enthielt je nach Ansatz 10-20 Mol Phenoxybenzamin pro Mol Serumalbumin. Daß tatsächlich eine kovalente Bindung mit Mercaptogruppen gebildet wird, konnte in einem Modellversuch mit Glutathion gezeigt werden: Sowohl radioaktives Phenoxybenzamin als auch radioaktives Glutathion finden sich nahezu quantitativ im Produkt wieder, das dünnschichtchromatographisch von den Ausgangssubstanzen unterschieden werden kann. Hydrolyse des Produktes und Aminosäureanalyse zeigen, daß nur der Cystein-Rest derivatisiert wurde. (Zu Einzelheiten der Kopplungsprozedur sowie der Analyse des Produktes, vgl. Abschnitt 3.9).

Tab. 31 Die spezifische Bindung von ^3H -Phenoxybenzamin an Anti-Phenoxybenzamin-Serum wird durch die unmarkierte Substanz gehemmt. 16 000 cpm ^3H -Phenoxybenzamin wurden eingesetzt. Antiserumverdünnung 1:50. Unspezifische Bindung in Gegenwart von Präimmunsrum (1:50 verdünnt) an Stelle des Antiserums (Mittelwert $\pm$ S.A.): 2160 ± 750 cpm (Triplikate). Angegeben ist die spezifische Bindung (Gesamtbindung - unspezifische Bindung), Mittelwerte $\pm$ S.A. (Triplikate).

unmarkiertes Phenoxybenzamin (pMol)	^3H -Phenoxybenzamin spezifisch gebunden (cpm)
0	3710 ± 790
5	3540 ± 220
10	3030 ± 950
50	1980 ± 50

Von 10 mit den so hergestellten Konjugaten immunisierten Kaninchen entwickelte einen Antikörper, die durch spezifische Bindung von ^3H -Phenoxybenzamin nachgewiesen wurden. Kaltes Phenoxybenzamin verhindert die Bindung des radioaktiven Liganden (Tab. 31).

Erste Versuche mit einer durch Ammonsulfat-Fällung und DEAE-Sephadex-Chromatographie vorgereinigten Antikörperlösung ergaben keinen Hinweis auf eine spezifische Immunfluoreszenz im indirekten Fluoreszenztest nach Bindung von Phenoxybenzamin an die Zellen und Behandlung mit Anti-Phenoxybenzamin-Serum. Dies ist bei der zu erwartenden geringen Anzahl von Rezeptoren nicht verwunderlich. Eine Methode zur Affinitätschromatographischen Reinigung der Antikörper wird zur Zeit ausgearbeitet. Erst Untersuchungen mit hochgereinigten und radioaktiv (z.B. ^{125}I -) markierten Antikörpern werden zeigen können, ob die postulierte "Hapten-Sandwich"-Bindung am Affinitätsmarkierten Rezeptor stattfindet.

3. Experimenteller Teil

3.1 Apparate, Geräte, Hilfsmittel

Zusätzlich zu den von Traber (175) beschriebenen Hilfsmitteln wurden verwendet:

3.1.1 Zellkultur

Nylongewebe 212 um Porenweite (Nr. Normal, 6-212) und 132 um Porenweite (Nr. Normal, 10-132), Nybolt Nylon bolting cloth, Schweizerische Seidengazefabrik, Zürich

Plastikwaren der Fa. Nunc Plastic, über Fa. Mediapharm, Aschaffenburg

Folien Schweißgerät, Fa. R. Opitz, München

Präparierbesteck, Fa. L. Empfenzeder, München

Druckfiltrationsgerät, Fa. Sartorius, Göttingen

Schüttler, Modell G 25, New Brunswick Sci. Comp.

Stereomikroskop M 7, Fa. Wild, Heerbrugg

3.1.2 Bestimmung cyclischer Nukleotide

Mikroliterzentrifuge, Fa. Hettich, Tuttlingen

3.1.3 Sonstiges

Ultrazentrifuge L2 - 65 B und L3 - 50, Beckmann

Forschungsmikroskop STANDARD WL mit Fluoreszenz-Auflichtkondensator IV FI. Filterkombination: KP500, KP490, FT510, LP520. Zeiss, Oberkochen

UV-Durchflußmonitor ISCO, Modell UA-5 mit Multiplexer-Expander, Modell 1132

3.2 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Chemikalien sind identisch mit den von Traber (175) beschriebenen oder wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen und besaßen die höchste erhaltliche Reinheit. Die Bezugsquellen einiger spezieller Substanzen sind an der entsprechenden Stelle im Text erwähnt.

3.2.1 Allgemeine Chemikalien

S-Acetyl-Mercaptobernsteinsäureanhydrid: Sigma, München

Albumin (Kaninchenserum): Calbiochem, über Fa. Päsel KG, Frankfurt am Main

2-(2-Aminoäthyl)pyridin (HCl)₂: Smith, Kline and French, Hertfordshire (Geschenk)

2-(2-Aminoäthyl)thiazol (HCl)₂: Smith, Kline and French, Hertfordshire (Geschenk)

ACEI: Beckmann über Fa. Päsel KG, Frankfurt am Main

1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)carbodiimid metho-p-toluolsulfonat, Serva, Heidelberg

2'-Desoxyadenosin: Sigma, München

Dipyridamol (Persantin): Fa. K. Thomae, Biberach an der Riss

Freund's Adjuvans, komplett: Calbiochem, über Fa. Päsel KG, Frankfurt am Main

Freund's Adjuvans, inkomplett: Behringwerke, Marburg, Lahn

γ-Globulin (Kaninchen): Calbiochem, über Fa. Päsel KG, Frankfurt am Main

Glutaraldehyd, 25%ige Lösung: Fa. Serva, Heidelberg

Glutathion, reduziert: Boehringer/Mannheim

Guanosin - 3':5'-monophosphat, Mononatriumsalz: Boehringer/Mannheim

Penicillin G, Kaliumsalz: Serva, Heidelberg

Natriumsalz: Hoechst, Frankfurt am Main

Phenoxybenzamin: Interchem, München

Poly-L-Lysin-HBr, Type 1-B, Mol.Gew. 70 000, Sigma, München

Pyrilamin-Maleat (Mepyramin): Dolder, Basel (Geschenk)

DEAE-Sephadex A50: Pharmacia, Frankfurt am Main

Sephadex LH20: Pharmacia, Frankfurt am Main

Sepharose 4B, CNBr-aktiviert: Pharmacia, Frankfurt am Main

Streptomycinsulfat: Serva, Heidelberg

Theophyllin: Sigma, Merck, Calbiochem, über Fa. Päsel KG,
Frankfurt am Main

3.2.2 Antikörper

Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen- γ -Globulin (GARGG):

Calbiochem, Päsel KG, Frankfurt am Main

Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen- γ -Globulin, konjugiert
mit Fluoresceinisothiocyanat: Behringwerke, Marburg, Lahn

3.2.3 Enzyme

Pronase P (*Streptomyces griseus*): Serva, Heidelberg

Alkalische Phosphatase (*E. coli*), 1 mg/ml: Boehringer/Mannheim

Collagenase (*Cl. histolyticum*), Reinheitsgrad II: Boehringer/
Mannheim

Phosphodiesterase (Rinderherz) 10 mg/ml: Boehringer/Mannheim

Ribonuclease: Boehringer/Mannheim

3.2.4 Radiochemikalien

Enkephalin (5-L-Methionin) (Tyrosyl-3,5- ^3H (N)) 20.1 Ci/
mMol: NEN, Dreieichenhain/Frankfurt am Main

(8- ^3H)-Guanosin-3':5'-Monophosphat, cyclisch, Ammoniumsalz,
21 Ci/mMol: Amersham-Buchler, Braunschweig

(Benzyl- ^3H)-Phenoxybenzamin-HCl, 1.7 Ci/mMol: Amersham Buchler,
Braunschweig

3.3. Zellkultur

3.3.1 Verwendete Zell-Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linien C6-BU-1 und
108CC15 sind identisch mit den von Traber (175) beschriebenen.

3.3.2 Allgemeine Zellkulturmethodik

Alle im Folgenden nicht beschriebenen Methoden waren iden-
tisch mit den von Traber (175) ausführlich dargestellten.

3.3.2.1 Verwendete Lösungen

Für Primärkulturen werden zusätzlich zu den beschriebenen
(175) folgende Lösungen benötigt:

1) Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (PS):

2 Millionen Einheiten Penicillin und 2 g Streptomycinsulfat
zusammen in 100 ml Wasser lösen und steril filtrieren. In
Portionen zu 5 ml steril einfrieren. Bei -20°C aufbewahren.

2) DMEM/ 10% FCS/PS 20:

1 ml PS-Stammlösung auf 1 l DMEM/ 10% FCS (steril zugeben).

3) DMEM/10% FCS/PS 100:

5 ml PS-Stammlösung auf 1 l DMEM/ 10% FCS (steril).

4) D1(1x) Glucose/Sucrose/Phenolrot/PS 200 (D1Gluc/Suc/PS 200):

10 ml PS-Stammlösung auf 1 l D1(1x) Glucose/Sucrose/Phenolrot.

5) Embryo-Extrakt (nach: 303)

Verwendet werden 10 Tage alte Hühnerembryonen (etwa 60-100 pro Ansatz).

Die Embryonen unsteril aus den Eiern entnehmen und in einem Meßzylinder vereinigen;

Volumen ablesen;

2x mit dem gleichen Volumen an kaltem D2 waschen, Waschlösung abdekantieren;

das gleiche Volumen D2 (kalt) zugeben;

4x 15 sek homogenisieren (Sorvall Omnimix) unter Kühlung im Eisbad;

1 h im Eis stehen lassen;

30 min bei 15 000 g zentrifugieren;

Überstand 30 min bei 35 000 g zentrifugieren;

Überstand über Nacht einfrieren;

auftauen, bei 15 000 g zentrifugieren;

Überstand steril filtrieren (Druckfiltration, 10 atm N₂);

in Portionen zu 5 ml steril einfrieren;

bei -20°C oder besser über flüssigem Stickstoff aufbewahren.

6) DMEM/ 10% HS/ 1% Embryo-Extrakt/PS 100 (Skelettmuskel-Standard-Medium)

900 ml DMEM

100 ml HS

10 ml Embryo-Extrakt

5 ml PS-Stammlösung

7) DMEM/ 20% FCS/ 10% Embryo-Extrakt/PS 100 (FE-Medium)

70 ml DMEM
20 ml FCS
10 ml Embryo-Extrakt
0.5 ml PS-Stammlösung

3.3.2.2 Subkultivieren von Zellen

Abweichend von der beschriebenen (175) Methodik wurde in dieser Arbeit zur Vorbereitung von Replika-Platten (zur Bestimmung der cyclischen Nukleotide o.ä.) stets so verfahren, daß die Zellen in der gesamten notwendigen Mediummenge suspendiert und Medium und Zellen gemeinsam in die Platten überführt werden.

3.3.3 Primärkulturen

Allgemeines:

Alle Dissektionen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Präparierbesteck wird durch kurzes Eintauchen in 70% Alkohol und Abflammen sterilisiert.

Beutel aus Nylonnetz zur mechanischen Dissoziation von Hirngewebe (2 x 5 cm, 212 µm Porenweite) oder zur Filtration von Zellsuspensionen (1 x 10 cm, 132 µm Porenweite) werden aus dem entsprechenden Nylongewebe (siehe Abschnitt 3.1.1) zurechtgeschnitten und an den Kanten mit einem Folien-Schweißgerät zusammengeschweißt. Sie können mit entsprechender Vorsicht wie oben sterilisiert werden, Autoklavieren ist jedoch vorzuziehen.

Alle Kulturen werden unter den auch für permanente Zell-Linien üblichen Standardbedingungen (37°C, 10% CO₂ in Luft, ca. 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

3.3.3.1 Hirnkulturen

Zur Herstellung von Primärkulturen aus dem Gehirn wurden in dieser Arbeit durchweg neonatale Mäuse oder perinatale (19-21 Tage in utero) Mäuseembryonen verwendet. Perinatale Embryonen wurden aus ätherbetäubten, schwangeren Mäusen durch Kaiserschnitt entnommen. Die Vorschrift orientiert sich an der von Schrier (119) angegebenen Methode.

Die Mäuse werden durch kurzes Eintauchen in 70% Alkohol sterilisiert, in D1 Gluc/Suc/PS 200 gewaschen, durch Decapitieren getötet und das Gehirn durch leichten Druck auf das Hinterhaupt durch das Cranialrohr herausgepreßt. Die Hirnmasse wird in eine Kulturschale (35 mm Durchmesser) mit 10 ml eiskaltem D1 Suc/Gluc/PS 200 überführt und auf dem Eis aufbewahrt. Etwa 10-20 so isolierte Gehirne werden in einen Beutel aus Nylonnetz (ca. 2x5 cm, 212 um Porenweite) gefüllt und durch leichtes Massieren mit einer Pinzette (stumpf, gebogen) durch die Poren des Netzes in 20 ml eiskaltes D1 Suc/Gluc/PS 200 gepreßt. Die entstandene Zellsuspension wird durch einen weiteren Nylonbeutel (1 x 10 cm, 132 um Porenweite), der in einem sterilen Zentrifugenbecher steht, filtriert, der Beutel entfernt und die Zellen 5 min bei 400 g zentrifugiert. Die Zellen werden in der geeigneten Menge kaltem Wachstumsmedium (DMEM/ 10% FCS/PS 20) aufgenommen und gezählt. Aus 10 Gehirnen wurden etwa 8-10 x 10⁷ lebensfähige Zellen erhalten. Präparationen, in denen die Lebensfähigkeit weniger als 50% beträgt, sollten nicht verwendet werden.

Die Zellsuspension wird auf 6×10^5 Zellen pro ml mit kaltem Wachstumsmedium verdünnt und jeweils 5 ml davon in Kulturschalen mit 60 mm Durchmesser bzw. 15 ml in Kulturschalen mit 85 mm Durchmesser überführt und unter Standardbedingungen (siehe oben) inkubiert. Nach unseren Erfahrungen sollte in dieser Zeit der Inkubator möglichst wenig geöffnet werden, da die Fähigkeit der Zellen, an die Plastikoberfläche anzuhaften, offensichtlich stark von Schwankungen der Temperatur bzw. des CO_2 -Gehaltes der Luft beeinflusst wird.

Nach 6 Tagen wird das Medium erneuert. Die Kulturen werden von jetzt an ohne weiteren Mediumwechsel bis zum Zeitpunkt der Verwendung inkubiert. Häufiges Öffnen des Inkubators sollte weiterhin vermieden werden.

3.3.3.2 Skelettmuskel-Kulturen (modifiziert nach (303))

Zur Herstellung von Skelettmuskel-Kulturen wurden neonatale Mäuse und Ratten (bis zu 3 Tagen post partum) sowie Mäuseembryonen (19-20 Tage in utero) verwendet. Die Embryonen werden durch Kaiserschnitt entnommen wie unter 3.3.3.1 beschrieben.

Nach kurzem Eintauchen in 70% Alkohol und Decapitierung werden die Oberschenkel mit Hilfe einer kleinen, gebogenen Schere abgetrennt und in eine Kulturschale (85 mm Durchmesser) mit 10 ml eiskaltem D1 Gluc/Suc/PS 200 überführt. Unter dem Stereomikroskop werden die Häute sorgfältig entfernt (feine anatom. Pinzette, Skalpell mit spitzem Messer), das Muskelgewebe von den Knochen abgetrennt und in eiskaltem D1 Gluc/Suc/PS 200 aufbewahrt. Die Gewebeteile werden anschließend in einer Kulturschale mit der Schere (klein, gebogen), in etwa 1 mm^3 große Stückchen zerschnitten und in eine sterile Glasflasche mit Schraubverschluß

(100 ml) überführt (gebogene anatom. Pinzette). 10 ml einer Collagenase/Trypsin-Lösung (0.25% Collagenase, 0.025% Trypsin in D1 Suc/Gluc/PS 200) werden zugefügt und das Gemisch 15-20 min bei 37°C geschüttelt (Schüttler-Einstellung auf etwa 160 Umdrehungen pro min). Anschließend wird 10 sek auf dem "Vortex" gemischt (höchste Einstellung). Nach Absitzen der Gewebestückchen wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Enzymbehandlung wird wiederholt und das Gemisch etwa 10 mal mit einer 10 ml Pipette (weite Öffnung) heftig trituriert. Die abgelösten Zellen im Überstand werden abgenommen, in einen sterilen Zentrifugenbecher zu 5 ml FCS gegeben und im Eis aufbewahrt. Der Prozeß wird, wenn erforderlich, noch einmal mit den noch undissoziierten Gewebestückchen wiederholt. Die vereinigten Überstände werden 10 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml Skelettmuskel-Standard-Medium (vgl. Abschnitt 3.3.2.1) resuspendiert. Um noch vorhandene, undissoziierte Gewebestückchen zu entfernen, wird die Suspension durch einen Beutel aus Nylongaze (1 x 10 cm, 132 µm Porenweite) filtriert wie unter 3.3.3.1 beschrieben. Anschließend wird auf eine zur Zellzählung geeignete Zelldichte ($1-2 \times 10^6$ Zellen/ml) mit Standard-Medium verdünnt.

$1-5 \times 10^8$ lebensfähige Zellen werden mit 30 ml Standard-Medium in Kulturschalen (150 mm Durchmesser) 40 h bei 37°C unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wird das Wachstumsmedium abgenommen. Die angehefteten Zellen werden durch Trypsinbehandlung (175) abgelöst und gezählt. Zur Reduzierung des Fibroblastengehaltes der Kulturen wird eine Zwischeninkubation durchgeführt: $1-5 \times 10^8$ Zellen werden in 20 ml Standard-Medium in Kulturschalen (150 mm Durchmesser) 45 min unter Standardbedingungen inkubiert. Die überstehende Zellsuspension wird abgenommen und gezählt, die angehefteten Zellen werden verworfen.

Zur direkten Fusion der Myoblasten werden 3×10^6 Zellen in 5 ml Standard-Medium auf Gelatine-beschichteten (siehe unten) Kulturschalen (60 mm Durchmesser) plattiert und unter Standardbedingungen inkubiert. Fusion zu Myotubuli erfolgt innerhalb der nächsten 48 Stunden. Zur Gewinnung größerer Myoblastenmengen werden 0.5×10^6 Zellen wie oben plattiert. Als Wachstumsmedium wird "FE-Medium" (vgl. Abschnitt 3.3.2.1) verwendet. In diesem Medium hält die Proliferation der Myoblasten bis zu sehr hohen Zelldichten (nahezu Konfluenz) an.

Gelatine-beschichtete Kulturschalen:

Eine 0.01% Gelatine-Lösung in destilliertem Wasser (erhitzen) wird autoklaviert. Je 3 ml der Lösung werden in die Kulturschalen gegeben. Nach 2 h Inkubation in der Kälte wird die Gelatine-Lösung abgesaugt und die Zellsuspension in Wachstumsmedium zugegeben.

3.3.3.3 Herzmuskel-Kulturen

Nach der im Vorstehenden beschriebenen Methode (Abschnitt 3.3.3.2) können auch Herzmuskel-Kulturen hergestellt werden. Zur Entnahme des Herzens wird den wie beschrieben sterilisierten und decapitierten Tieren mit einer Schere der Brustkorb geöffnet. Durch Spreizen der Rippen mit einer Pinzette und leichten Druck auf den Brustkorb tritt das Herz (meist noch schlagend) heraus und kann entnommen werden. Es wird mit der Schere in kleine Stückchen geschnitten und wie oben beschrieben, in Collagenase/Trypsin-Mischung in Einzelzellen dissoziiert: Als Kulturmedium wurde DMEM/ 10% FCS/PS 100 verwendet. Nach 24 h sind bei einem Großteil der Zellen spontane Kontraktionen zu beobachten.

3.4 Bestimmung cyclischer Nukleotide

3.4.1 Isolierung von cAMP-Bindungsprotein

Die Gewinnung des cAMP-Bindungsproteins folgte in allen Einzelheiten der von Traber (175) modifizierten Vorschrift von Miyamoto et al. (304).

3.4.2 Isolierung von cGMP-Bindungsprotein (nach: 177, 178)

Alle Arbeitsschritte wurden bei 0°-4°C durchgeführt. 290 g lebende Seidenspinnerpuppen (*Bombyx mori*) wurden in drei gleichen Portionen mit jeweils 400 ml 5 mM Magnesium-Acetat/4 mM Na₂EDTA-Lösung (mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt, eiskühlt) unter Kühlung im Eisbad homogenisiert. (Sorvall Omnimix, 3 x 1 min, je 1 min Pause dazwischen). Die Mischung wird bei 10 000 g 30 min zentrifugiert und die an der Oberfläche schwimmende Fettschicht vorsichtig abgenommen. Der Überstand wird abdekantiert, mit 1 N Salzsäure auf pH 4.9 eingestellt und erneut 30 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und mit 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt. Anschließend wird durch langsame Zugabe von kristallinem Ammoniumsulfat gefällt (0.34 g/ml). Während der Ammoniumsulfat-Zugabe wird der pH-Wert durch Zugabe von 1 M Kaliumphosphatpuffer zwischen 6.1 und 6.9 gehalten. Eine der verbrauchten Kaliumphosphatpuffer-Menge entsprechende Menge Ammoniumsulfat (0.34 g/ml) wird zusätzlich zugegeben. Anschließend wird 30 min in der Kälte gerührt und der Niederschlag abzentrifugiert (30 min, 10 000 g). Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag in etwa 100 ml 5 mM Kaliumphosphatpuffer/2 mM Na₂EDTA pH 7.0 gelöst. Eine geringe Menge ungelöst bleibender Substanz wird abzentrifugiert und der Überstand auf eine Sephadex-G25 Säule (6 x 25 cm) aufgetragen,

die mit dem Elutionspuffer äquilibriert ist. Eluiert wird mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer /2 mM Na₂EDTA pH 7.0. Die braungefärbten Fraktionen (150 ml), die die cGMP-bindende Aktivität enthalten, werden vereinigt und in Portionen zu 5 ml über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Test auf cGMP-bindende Aktivität erfolgt wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben.

3.4.3 Inkubation von Zellen mit Hormonen, Extraktion der cyclischen Nukleotide

Die Inkubation der Zellen mit Drogen sowie die Extraktion der cyclischen Nukleotide folgt bis auf wenige Ausnahmen exakt der von Traber (175) angegebenen Prozedur. In der folgenden Kurzfassung der Methode sind alle Ausnahmen von der ursprünglichen Vorschrift ausführlich beschrieben.

Die Kulturen werden im allgemeinen auf Plastikpetrischalen von 60 mm Durchmesser gezüchtet, wenn nur cAMP gemessen werden sollte. Ausnahmen sind jeweils an der entsprechenden Stelle vermerkt. Wenn die Zellen zur Bestimmung des cGMP-Spiegels verwendet werden sollen, werden Petrischalen von 85 mm Durchmesser verwendet. Der Zellrasen wird mit 2 ml (60 mm Platten) bzw. 5 ml (85 mm Platten) Inkubationsmedium (175) gewaschen. 2 ml bzw. 5 ml Inkubationsmedium sowie die Drogenmischungen (in Wasser) werden zugegeben. Wenn das Volumen der Drogenmischung 60 bzw. 150 µl überschreitet, werden die Drogen in Inkubationsmedium gelöst und die zugegebene Menge an Inkubationsmedium entsprechend reduziert. Drogen, die in Wasser unlöslich sind (Prostaglandin, Phenoxylbenzamin), werden als alkoholische Lösung zugegeben (maximal 2% Alkohol im Endvolumen, Kontrollwerte erhalten die gleiche Menge Alkohol). In den Fällen, in denen es möglich ist, die Drogenzugabe innerhalb von 30 sek zu bewerkstelligen, werden 3 Replikaplaten gleichzeitig angesetzt und die Inku-

bationen jeweils um die entsprechende Zeitspanne verschoben, abgestoppt.

In einigen Versuchen wurden die Kulturschalen nach Zugabe des Inkubationsmediums vor der Drogenzugabe einige Stunden weiterinkubiert. Dies ist an den entsprechenden Stellen angegeben.

Nach der Drogenzugabe werden die Zellen bei 37°C inkubiert. Wenn die Inkubationszeit kürzer als 2 min ist, wird auf dem Wasserbad, in allen übrigen Fällen im CO₂-Inkubator (15% CO₂) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wird das Medium abgesaugt und durch Zugabe von 2 ml 8% TCA abgestoppt. Zur Ausbeutebestimmung werden 3-4 000 cpm ³H-cAMP bzw. 2 000 cpm ³H-cGMP zugesetzt. Zur Entfernung der TCA wird 5 x mit Äther (2 ml) extrahiert.

3.4.4 Anionenaustauscherchromatographie; Trennung von cAMP und cGMP

Da cAMP in 10-fachem Überschuß den cGMP-Test stört (siehe Abschnitt 2.1.2.4), müssen die beiden Nukleotide vor der Bestimmung voneinander getrennt werden. Dies geschieht nach (189) durch Anionenaustauscherchromatographie an Bio-Rad AG 1x2 Harz, 200 - 400 mesh, in der Cl-Form.

Wir verwenden Pasteurpipetten (0.5 cm Durchmesser) mit aufgesetztem Plastiktrichter, die bis zu einer Höhe von 4 cm mit dem Harz gefüllt werden. Der Auslauf der Säule wird zweckmäßigerweise mit einer Glaskugel verstopft. Darauf wird ein einige Millimeter hohes Bett von Bio-Rad AG 1x8, 100 - 200 mesh, gelagert. Das grobkörnige Harz verhindert ein Auslaufen des feinkörnigen AG 1x2 Harzes. Die TCA-freien Zell-extrakte (siehe Abschnitt 3.4.3) werden aufgetragen und die Säulen mit 10 ml Wasser gewaschen. cAMP wird mit 6 ml 0.05 N

Salzsäure und cGMP anschließend mit 6 ml 0.5 N Salzsäure eluiert. Die Eluate werden in Szintillationsgefäßen aufgefangen, eingefroren und lyophilisiert. Um letzte Spuren von cAMP abzutrennen, wurde in dieser Arbeit grundsätzlich eine Rechromatographie durchgeführt: Die lyophilisierten cGMP-Fractionen werden in 1 ml Wasser aufgenommen und auf die regenerierten (siehe unten) Säulen aufgetragen. cAMP-Reste werden mit 0.05 N Salzsäure eluiert und verworfen. cGMP wird mit 0.5 N Salzsäure eluiert und wie oben aufgefangen und lyophilisiert.

Zur Regenerierung werden die Säulen 2x mit je 10 ml 5 N Salzsäure gewaschen und anschließend mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gespült (in der Regel 20 ml).

Der Trennerfolg dieser Fraktionierung der beiden cyclischen Nukleotide wurde durch folgendes Experiment nachgeprüft: 10 wie oben beschrieben hergestellte Säulen werden je mit einer Mischung aus 10 000 pMol cAMP und 10 pMol cGMP beladen. Bei 5 Säulen enthielt die Mischung zusätzlich 4.3×10^6 cpm ^3H -cAMP, bei den anderen 5 1.7×10^5 cpm ^3H -cGMP. Beide Serien von Säulen wurden wie beschrieben mit Wasser gewaschen und die cyclischen Nukleotide eluiert. Die cGMP-Fractionen beider Säulen-Serien wurden nach Entnahme eines aliquoten Anteils zur Radioaktivitätsbestimmung wie beschrieben rechromatographiert. Die lyophilisierten Fractionen wurden in 1 ml Wasser gelöst und in 10 ml Rotiszint-Szintillationsmischung die Radioaktivität bestimmt.

Tab. 32 zeigt die Ausbeuten an cyclischen Nukleotiden sowie die Kreuzverunreinigungen nach beiden Säulenschritten in Prozent der eingesetzten Radioaktivität (Mittelwerte der 5 Säulen $\pm$ S.A.).

Tab. 32 Kreuzverunreinigungen und Ausbeuten nach Trennung von cAMP und cGMP durch Anionenaustauscherchromatographie in Prozent.

	cAMP-Fraktion (0.05 N HCl)		cGMP-Fraktion (0.5 N HCl)	
	Verunreinigung durch cGMP	Ausbeute cAMP	Verunreinigung durch cAMP	Ausbeute cGMP
nach 1. Säulenschritt	0.8 [±] 0.1	91 [±] 1	1.9 [±] 0.5	98 [±] 6
nach 2. Säulenschritt			0.2 [±] 0.02	88 [±] 4

Die Verunreinigung der cGMP-Fraktion durch cAMP beträgt also etwa 0.2% des vorhandenen cAMP. Dies ist ein Wert, der bei den meisten Versuchen toleriert werden kann.

3.4.5 Proteinbindungstest für cAMP

Die Bestimmung des cAMP nach (174) erfolgt in allen Einzelheiten gemäß der von Traber (175) gegebenen Vorschrift.

3.4.6 Proteinbindungstest für cGMP

Das Aufnehmen der Proben in Wasser, die Ausbeutebestimmung und das Zusammenpipettieren des Testansatzes erfolgt völlig analog zur cAMP-Bestimmung (175). In den Test wurden 0.6 pMol ³H-cGMP eingesetzt; dies entspricht bei der spezifischen Aktivität des von uns benutzten ³H-cGMP etwa 8 000 cpm. Das Bindungsprotein wird so verdünnt, daß etwa 2 000 - 3000 cpm gebunden werden. Die Eichgerade wird mit 0.5, 1.0, 2.0 und

3.0 pMol cGMP aufgenommen (Triplikate). Das radioaktive ^3H -cGMP, der Puffer (0.2 M Acetat, pH 4.0) sowie die cGMP-Standardlösung enthalten 1 mg/ml BSA. Das Bindungsprotein enthält 5 mg/ml BSA.

Tab. 33 Pipettierschema für den cGMP-Test (Volumina in μl)

Probe-Nr.	^3H -cGMP (50 μM)	Puffer	H_2O	cGMP (0.1 μM)	Probe	Bindungs- protein	Bemer- kung
1,2	20	50	130	-	-	-	Leerwert
3-5			100	-	-	30	Null- Standard (Werte I_0)
6-8			95	5	-		Eichkurve (Werte I_x)
9-11			90	10	-		
12-14			80	20	-		
15-17			70	30	-		
18ff			-	-	100		Proben (Werte I)

Die Bestandteile des Inkubationsgemisches werden in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert, gemischt (Vortex) und mindestens 40 min im Eis inkubiert. Dann werden 200 μl 3.8 M Ammoniumsulfatlösung zugegeben, sorgfältig gemischt und 10 min auf dem Eis weiterinkubiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (2 min Hettich-Mikroliter-Zentrifuge), mit 200 μl 2.7 M Ammoniumsulfat gewaschen und in 1 ml Wasser gelöst. Das Reaktionsgefäß mit der Lösung wird in ein Szintillationsgefäß überführt und in 10 ml Rotiszint die Radioaktivität gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt wie bei der cAMP-Bestimmung (175).

3.5 Radioimmunologische Bestimmung von Enkephalin

3.5.1 Synthese von jodiertem Leu-Enkephalin

Leu-Enkephalin wurde jodiert in Anlehnung an die von Morgat und Mitarbeitern (305) für Oxytocin beschriebene Methode.

4 mg Leu-Enkephalin (7.2 μMol) werden in 1.58 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.4 gelöst und in einem Zentrifugenglas unter Eiskühlung gerührt. 2.92 mg Jodchlorid (18.0 μMol) gelöst in 180 μl Methanol werden in Portionen zu 10 μl über einen Zeitraum von 20 min verteilt zugegeben. Dabei fällt im allgemeinen etwas Peptid aus. Anschließend wird noch 30 min unter Eiskühlung gerührt und dann 1 ml 0.1 M Natriumthiosulfat zugegeben. Die Mischung wird weitere 10 min im Eis gerührt und dann zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in Eis aufbewahrt oder eingefroren. Der Niederschlag kann zum Teil wieder in H_2O gelöst werden. Die ungelösten Bestandteile werden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Sephadex LH 20-Chromatographie des Jodierungsansatzes

Die beiden Überstände aus 3.5.1 wurden in dieser Arbeit getrennt weiterverarbeitet. Die Lösung wird zur Entsalzung auf eine Sephadex LH 20-Säule (1.5 x 52 cm, äquilibriert mit H_2O) aufgetragen und mit H_2O eluiert. Fraktionen zu 1.8 ml werden aufgefangen (Laufgeschwindigkeit 12 ml/h). Die Gipfelfraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert. Die Gipfel werden durch ihre UV-Spektren identifiziert (vgl. Abb. 36).

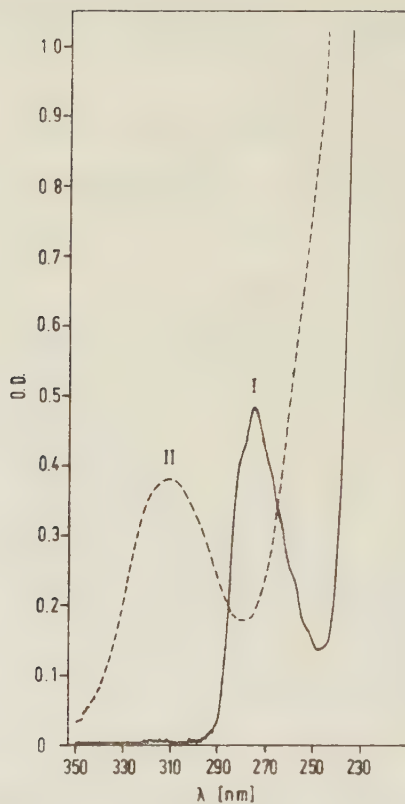


Abb. 36 UV-Spektren von Leu-Enkephalin (Kurve I, $\lambda_{\max}$ 275 nm, pH 7.1) und Di-Jod-Leu-Enkephalin (Kurve II, $\lambda_{\max}$ 312 nm, pH 7.1).

Beide Überstände (lösliches und ausgefallenes Peptid) zeigten gleiches Laufverhalten auf Sephadex LH 20. Die UV-Spektren der Jod-Enkephalin-Gipfel waren identisch. Die Reaktion verläuft im allgemeinen quantitativ (keine Verunreinigung des Produktes durch nicht umgesetztes Enkephalin). Die Ausbeute (einschließlich des wieder gelösten Teils des ausgefallenen Peptids) beträgt 80-90%.

In einem weiteren Ansatz, der in 100 mM Kaliumphosphatpuffer durchgeführt wurde, verlief die Reaktion nicht quantitativ. Das UV-Spektrum entsprach einem Gemisch aus Enkephalin und Jod-Enkephalin (vgl. Abb. 36). Jod-Enkephalin und nicht umgesetztes Enkephalin konnten jedoch durch Sephadex LH 20 Chromatographie voneinander getrennt werden. Die Säulenchromatographie wurde wie oben beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.1 zum Äquilbrieren und zur Elution verwendet wurde. Abb. 37 zeigt das erhaltene Elutionsprofil.

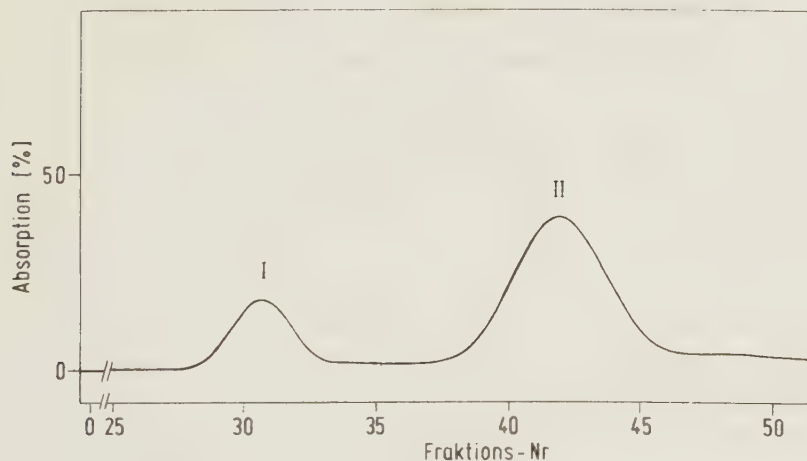


Abb. 37 Trennung von Di-Jod-Leu-Enkephalin (Gipfel II) und Leu-Enkephalin (Gipfel I) über Sephadex LH 20. Weitere Angaben im Text.

3.5.2 Katalytischer Jod-Tritium-Austausch und radiochemische Reinheit des Produktes.

Der katalytische Jod-Tritium-Austausch am jodierten Enkephalin wurde für uns von der Firma Amersham-Buchler durchgeführt. Das erhaltene Produkt hatte eine spezifische Aktivität von 41 Ci/mmol (berechnet nach eingesetztem Di-Jod-Enkephalin) und eine radiochemische Reinheit von >99% (Dünnschichtchromatographie in n-Butanol: Eisessig: Wasser 80:20:20). Es wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

3.5.3 Herstellung von enkephalin-spezifischen Antikörpern

3.5.3.1 Kopplung von Enkephalin an BSA und Polylysin

3.5.3.1.1 Carbodiimid-Kopplung

Kopplung an BSA:

5.36 mg Leu-Enkephalin, 5.0 mg BSA und 13.8 uCi ^3H -Leu-Enkephalin werden zusammen in 0.5 ml destilliertem Wasser gelöst, 100 mg CDI in 0.5 ml Wasser zugegeben und gemischt. Der pH-Wert der ungepufferten Lösung beträgt 6.0. Die Mischung wird mit Stickstoff begast, über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend 3 Tage gegen 3 x 1 l PBS dialysiert. Zu Beginn der Inkubation bildet sich ein weißer Niederschlag, der sich später wieder löst. Aus der gebundenen Radioaktivität wird die Bindung von Enkephalin ans Protein berechnet. 2-5 Mol Enkephalin werden pro Mol BSA gebunden. Variation der Mengenverhältnisse und des pH-Wertes führten zu keiner Verbesserung der Bindung.

Kopplung an Polylysin:

4.7 mg Leu-Enkephalin, 1 mg Poly-L-Lysin (Mol. gew. > 70 000)

und 13.8 uCi ^3H -Leu-Enkephalin werden zusammen in 0.5 ml Wasser gelöst, 100 mg CDI in 0.5 ml Wasser zugegeben und gemischt. Der pH-Wert der ungepufferten Lösung ist 6.0. Die Mischung wird mit Stickstoff begast, über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert, dann 3 Tage gegen 3 x 1l PBS dialysiert und die gebundene Radioaktivität gemessen. 2-6 Mol Enkephalin werden pro Mol Polylysin gebunden. Ein während der Inkubation gebildeter Niederschlag von gummiartiger Konsistenz löst sich während der Dialyse wieder auf.

3.5.3.1.2 Glutaraldehyd-Kopplung

11.1 mg (20 uMol) Leu-Enkephalin, 14 mg (0.2 uMol) BSA und 13.8 uCi ^3H -Leu-Enkephalin werden zusammen in 0.1 M KPP pH 7.0 gelöst und bei Zimmertemperatur unter stetem Einstrom von N_2 gerührt. 1 ml einer frisch hergestellten 0.21 M Glutaraldehydlösung wird zugetropft und die Mischung bei Zimmertemperatur noch 4 h weiterinkubiert (N_2 -Einstrom). Anschließend wird bei $0^\circ\text{--}4^\circ\text{C}$ 24 h gegen Wasser (2x Wechsel) und dann 12 h gegen PBS (2x Wechsel) dialysiert.

28 Mol Enkephalin/Mol BSA wurden unter diesen Bedingungen gebunden. Bei Verwendung von 0.02 M Glutaraldehyd wurden 15 Mol Enkephalin/Mol BSA gebunden. In analoger Weise wurde die gleiche Menge Enkephalin auch an 17.5 uMol Polylysin gekoppelt. Das entstandene Konjugat war unlöslich und enthielt 220 Mol Enkephalin/Mol.

3.5.3.2 Immunisierung von Kaninchen

Die nach 3.5.3.1.1 und 3.5.3.1.2 hergestellten Konjugate werden auf eine Konzentration von 1 mg/ml mit PBS verdünnt und durch Membranfiltration sterilisiert. Die Lösung wird

mit dem gleichen Volumen an sterilem Freund'schen Adjuvans versetzt und sorgfältig emulgiert. Dazu wird die Mischung mindestens 50 mal in eine Injektionsspritze (10 ml Volumen) aufgezogen und heftig wieder herausgepreßt. Etwa zweistündiges Mischen auf dem Vortex-Mischgerät (höchste Einstellung) erfüllt den gleichen Zweck. 2 ml der Emulsion werden pro Kaninchen, über 4-6 Stellen auf beiden Seiten des Rückgrates verteilt, intradermal sowie in beide Oberschenkel intramuskulär gespritzt. 9 Kaninchen wurden mit dem nach 3.5.3.1.2 hergestellten Enkephalin-BSA-Konjugat immunisiert. "Booster"-Injektionen erfolgten mit dem wie oben emulgierten Antigen subcutan. Dabei wurde der Mycobakteriengehalt die ersten drei Male vermindert, um schwere Hypersensitivitätsreaktionen zu vermeiden. Die folgende Aufstellung faßt den Ablauf der Immunisierung zusammen:

Tag	Antigen	Adjuvans	Applikation
1	1 mg in 1 ml PBS	komplett	i.c., i.m.
43	"	inkomplett	s.c.
153	"	1/4 komplett + 3/4 inkomplett	s.c.
195	"	komplett	s.c.

Testblutungen (ca. 10 ml aus der Ohrvene) erfolgten an den Tagen 99, 165, 205.

Je 3 Kaninchen wurden in analoger Weise mit den nach 3.5.3.1.1 hergestellten Konjugaten gespritzt. Nach der 2. Boosterinjektion konnten keine Antikörper nachgewiesen werden.

3.5.3.3 Gewinnung und Test der Antiseren

Das Blut wird in Glasgefäßen aufgefangen und etwa 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das geronnene Blut wird vollständig von der Glaswand gelöst, das Serum abgegossen

und zentrifugiert (400 g, 10 min). Der geronnene Rest wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, das noch freigesetzte Serum abgegossen, zentrifugiert und mit der ersten Fraktion vereinigt. Das Serum wird in einer Verdünnungsreihe fortlaufend 1:2 mit "RIA-Puffer" (50 mM Tris/HCl, 4 mM Na₃EDTA pH 7.5, 0.1% BSA) verdünnt.

50 ul ³H-Enkephalin (Leu- bzw. Met-) (auf 10 000 cpm mit Puffer eingestellt, entspricht ca. 0.3 pMol),

150 ul Puffer,

50 ul verdünntes Antiserum

werden in der angegebenen Reihenfolge in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, gemischt und 2 h bei 0° - 4°C inkubiert. Ansätze, die an Stelle des Antiserums Normalserum (in der entsprechenden Verdünnung) sowie nur Puffer enthalten, müssen als Kontrollen im Testansatz eingeschlossen sein. Die Testansätze werden als Duplikate ausgeführt. Nach der Inkubation werden die Proben mit BSA-freiem Puffer verdünnt. Anschließend wird die Lösung über Membranfilter (Cellulosenitrat, 0.45 µm Porenweite, Sartorius, Göttingen) abgesaugt, mit 10 ml BSA-freiem Puffer nachgewaschen, der Filter in 1 ml Methylcellosolve gelöst und in 10 ml Rotiszint die Radioaktivität bestimmt. Prozent spezifische Bindung wird gegen den Verdünnungsfaktor aufgetragen. Als Titer des Antiserums wurde in dieser Arbeit die Verdünnung angesehen, bei der 20% der eingesetzten Radioaktivität gebunden werden.

Der Ansatz kann auch mit Ammonsulfatlösung ausgefällt werden. Zu diesem Zweck wird nach der Inkubation 50 ul einer 0.2% γ-Globulinlösung (Kaninchen) zugegeben, gemischt, sofort 1 ml eiskalte 60% Ammonsulfatlösung zugefügt und wiederum gemischt. Nach 30 min Inkubation im Eis wird zentrifugiert (2 min, Hettich Mikroliter). Nach Absaugen des Überstandes und Lösen des Präzipitats in 1 ml Wasser wird die Radioaktivität bestimmt. Diese Methode führt aber zu etwa um eine Größenordnung höherer unspezifischer Bindung (cpm der Normalserum -Kontrolle). Von den 9 nach Abschnitt 3.5.3.2 immunisierten Kaninchen erzeugten 2 Antiseren von brauchbarem Titer, (50 bzw. 200 nach der zweiten Testblutung).

3.5.4 Erstellung einer Eichkurve zur Bestimmung von Enkephalin und Probenaufbereitung.

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und 2 ml 8% TCA zugefügt. Nach Zugabe von ^3H -Enkephalin zur späteren Bestimmung der Ausbeute der Aufarbeitung wird die TCA abgenommen und bis zur neutralen Reaktion mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird lyophilisiert und in einem geeigneten Volumen "RIA-Puffer" (vgl. 3.5.3.3) aufgenommen. In einem aliquoten Anteil wird die Ausbeute bestimmt. Ein Pipettierschema für die folgende radioimmunologische Bestimmung von Enkephalin zeigt Tab. 34. Die weitere Verarbeitung der Ansätze erfolgt wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

Tab. 34 Pipettierschema zur radioimmunologischen Bestimmung von Enkephalin (Angaben in μl)

Probe Nr.	^3H -Enkephalin (20 000cpm)	Puffer	Enkephalin Standard (0.1 μM)	verdünntes Antiserum	Bemerkungen
1-3	50	100	-	50	Null-Standard (I ₀)
					Eichwerte (I _x)
4-6		95	5		0.5 pMol
7-9		90	10		1.0 "
10-12		80	20		2.0 "
13-15		50	50		5.0 "
16-18		-	100		10.0 "
			Enkephalin Standard (1 μM)		
19-21		80	20		20 "
22-24		50	50		50 "
25-27		-	100		100 "
			Probe		
28 ff			100		Proben-Wert (I)
				verdünntes Normalserum	
0 ₁ - 0 ₃		100	-	50	(Leerwert)

3.6 Kopplung von Noradrenalin an Serum-Albumin und Sepharose und Versuche zur Zellkopplung.

NA (10-12 mg) wurde an Rinderserumalbumin mit Hilfe von Carbodiimid oder Glutaraldehyd gekoppelt analog den in den Abschnitten 3.5.3.1.1 und 3.5.3.1.2 für Enkephalin angegebenen Vorschriften.

CNBr-aktivierte Sepharose wird auf einer Glasfritte 15 min mit 0.001 N HCl gewaschen. 2 g Sepharose (Feuchtgewicht) werden zu einer Lösung von 4 mg BSA-NA-Konjugat in 4 ml 0.1 M Natriumbicarbonat/ 0.5 NaCl gegeben und in einem fest verschlossenen Zentrifugenglas über Nacht bei 4°C "kopfüber" rotiert. Die derivatisierte Sepharose wird auf einer Glasfritte sorgfältig mit D1 Suc/Gluc gewaschen. 0.5 ml gepacktes Gel werden in 2 ml DMEM suspendiert. 0.25 ml dieser Suspension werden mit 0.25 ml einer Suspension von C6-BU-1-Gliomazellen in DMEM (5×10^6 Zellen) versetzt und in einem festverschlossenen Reagenzglas 15 min bei Raumtemperatur, 37°C oder 4°C gemischt (kopfüber drehen oder manuell schütteln). Ein Tropfen der Suspension wird auf einem Objektträger im Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet.

3.7 Behandlung von Normalserum zur Charakterisierung des cAMP-Akkumulation hemmenden Serum-Faktors.

Alle verwendeten Seren wurden, soweit nicht anders vermerkt, 30 min bei 56°C inaktiviert.

3.7.1 Hitzebehandlung

Das Serum wird 1:10 mit Inkubationsmedium verdünnt und in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben, der sich in einem kochenden Wasserbad befindet. Der Kolben wird dabei so groß gewählt, daß das zugegebene Serum gerade den Boden bedeckt. Als Beginn der Inkubation wird der Zeitpunkt betrachtet, an dem das Wasserbad wieder kocht (ca. 30 sek nach Serumzugabe). Nach dem Hitzeschritt wird im Eis abgekühlt, auf das ursprüngliche Volumen mit dest. Wasser aufgefüllt und das erhitzte Serum 15 min bei 15 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird, wenn nicht sofort verwendet, bei 20°C eingefroren.

3.7.2 Säure-und Alkali-Behandlung

Alkali-Behandlung

2 ml Serum werden mit 1 N Natronlauge auf pH 12.0 gebracht und 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wird mit 1 N Salzsäure auf pH 7.4 gebracht und mit PBS auf 4 ml aufgefüllt.

Säure-Behandlung

2 ml Serum werden mit 1 N Salzsäure auf pH 1.0 gebracht und 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wird mit 1 N Natronlauge auf pH 7.4 eingestellt und mit PBS auf 4 ml aufgefüllt.

Kontrolle

2 ml Serum werden mit 1 ml NaCl (1 M) versetzt und 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wird mit PBS auf 4 ml aufgefüllt.

3.7.3 Herstellung von lipidfreiem Serum nach (293)

0.5 mg EDTA werden in 5 ml Kaninchenserum gelöst und in einem fest verschließbaren Zentrifugenbecher mit 10 ml einer Mischung von n-Butanol und Diisopropyläther (40:60 v/v) versetzt. Die Mischung wird 30 min bei Zimmertemperatur "kopfüber" gedreht und dann 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Die organische Phase wird abgenommen, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und in Alkohol aufgenommen. Das Serum wird mit einer Pipette vorsichtig von ausgefallenem Protein abgetrennt, zur Entfernung von n-Butanol-Resten mit 10 ml Diisopropyläther geschüttelt, 2 min bei 1000 g zentrifugiert und die organische Phase verworfen. Anschließend wird das Serum in eine kleine Saugflasche überführt, Wasserstrahl-Vakuum angelegt und vorsichtig auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Nach Entfernung der Diisopropylätherreste wird das lipidfreie Serum bei -20°C aufbewahrt.

Im Gegensatz zu den Angaben in der Original-Arbeit (293) wurde bei der Extraktion des Serums Ausfallen von Protein beobachtet. Die gleiche Beobachtung wird auch von anderen Autoren erwähnt (289).

3.7.4 Abtrennung von β -Lipoproteinen nach (290)

Lipoprotein-freies foetales Kalbsserum nach (290) sowie das Lipoprotein-Präzipitat (aus 115 ml Serum) wurden von Georg Reiser (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt.

Die Lipoproteine wurden in 105 ml 0.9% Natriumchloridlösung und 10 ml 0.7 M Kaliumoxalat-Lösung aufgenommen, vom Ungelösten abzentrifugiert und 24 h gegen PBS (5 l, 2x Wechsel) dialysiert.

3.7.5 Enzymbehandlung

5 ml erhitztes Serum (vgl. Abschnitt 3.7.1) werden mit 50 ul Alkalischer Phosphatase (1 mg/ml, E. coli), 5 mg Ribonuclease, 50 ul Phosphodiesterase (10 mg/ml, Rinderherz) oder 5 mg Pronase versetzt und im CO₂-Inkubator 2.5 h (Pronase) bzw. 30 min (übrige Enzyme) inkubiert. Anschließend wird zur Inaktivierung der Enzyme 2 min in vorerhitzten Reagenzgläsern im kochenden Wasserbad erhitzt und zentrifugiert. Der Überstand wird bis zur Verwendung im Eis aufbewahrt.

3.8 Gewinnung und Test von Antikörpern gegen Gliomazellen und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen

3.8.1 Herstellung der Antiseren (nach 306)

Als Antigene dienen entweder lebensfähig eingefrorene (175) oder aus den Kulturgefäßen abgelöste (175) Zellen. Zur Immunisierung werden die Zellen in einer geeigneten isoosmotischen Salzlösung (PBS, D1 Suc/Gluc, D2) suspendiert. Die Gewinnung der Seren erfolgte, wie in Abschnitt 3.5.3.3 beschrieben. Alle Seren wurden 30 min bei 56°C inaktiviert.

Antiseren gegen C6-BU-1-Gliomazellen:

C6-BU-1-Gliomazellen Passage 37 wurden mit D1 Suc/Gluc abgelöst und eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen 5 x mit je 10 ml D2 gewaschen und dann im entsprechenden

Volumen resuspendiert. Die Injektionen erfolgten gemäß folgender Protokolle:

Immunisierung von Meerschweinchen

Tag 1: 2.7×10^7 Zellen in 1 ml D2 intraperitoneal,
 2.7×10^7 Zellen in 0.5 ml D2 emulgiert mit
0.5 ml kompletten Freund'schen Adjuvans an 4
Stellen subcutan;

Tag 21: 2.7×10^7 Zellen in 1 ml D2 intraperitoneal;

Tag 28: Entbluten durch Herzpunktur.

6 Meerschweinchen wurden in der angegebenen Weise immunisiert.

Immunisierung von Kaninchen

2 Kaninchen erhielten durch die Ohrvene folgende Injektionen:

Tag	Zellzahl	Volumen D2
1	1×10^6	0.5 ml
4	2×10^6	0.5 ml
8	4×10^6	1.0 ml
16	8×10^6	1.5 ml
20	1.6×10^7	3.0 ml
22	2.4×10^7	5.0 ml
24	2.4×10^7	5.0 ml
26	2.4×10^7	5.0 ml

5 Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Tieren Blut abgenommen (10 ml aus der Ohrvene).

Antiseren gegen Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen

Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen, Klon 108CC15 wurden für jede Injektion neu angesät. Die Zellen wurden auf Kul-

turschalen (150 mm Durchmesser) bis zur Konfluenz gezüchtet, mit D1 Suc/Gluc gewaschen, durch 20 min Stehen in eiskaltem D1 Suc/Gluc abgelöst, zentrifugiert und in dem entsprechenden Volumen D1 Suc/Gluc resuspendiert. 6 Kaninchen erhielten Injektionen von jeweils 1 ml Zellsuspension in die Ohrvene nach folgendem Schema:

Tag	Zellzahl	Passagen	Lebensfähigkeit der Zellen
1	1×10^6	18	61%
10	2.25×10^6	19	72%
19	4.75×10^6	14	n. bestimmt
31	1×10^7	15	n. bestimmt
48	1.8×10^7	18	n. bestimmt
54	2×10^7	19/20	85%
60	2×10^7	21	80%
75	2×10^7	22	87%

7 Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren 20 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen.

Fällung der γ -Globuline

Die γ -Globuline werden durch Zugabe kalt-gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung bis 44% der Sättigung in der Kälte gefällt und nach Vervollständigung der Fällung (30 min im Eis) abzentrifugiert. Nach Waschen in 44% kalter Ammonsulfat-Lösung wird in Puffer (z.B. PBS, D2, DMEM) aufgenommen und gegen Puffer dialysiert (3x Wechsel, 12 h). Alternativ kann auch durch Zugabe einer 27% Na_2SO_4 -Lösung bis 18% der Sättigung und anschließender Inkubation des Gemisches für 16 h bei 37°C gefällt werden (306). Nach Waschen des Niederschlags in 18% Na_2SO_4 -Lösung wird wie oben in Puffer aufgenommen und dialysiert.

3.8.2 Test der Antiseren durch indirekte Immunfluoreszenz

Suspensionsmethode (nach 306)

Die Zellen werden mit D1 Gluc/Suc aus dem Kulturgefäß abgelöst (20 min im Kühlschrank), zweimal mit 5-20 ml D1 Suc/Gluc (je nach Zellmenge) gewaschen und eine Zellsuspension von $2-4 \times 10^6$ Zellen/ml hergestellt (An Stelle von D1 Suc/Gluc kann nun auch D2, PBS, DMEM oder eine ähnliche Salzlösung benutzt werden). 0.1 ml dieser Suspension werden mit 0.1 ml des (evtl. verdünnten) Antiserums (in isoosmotischem Puffer) gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle 5 min wird vorsichtig (manuell) geschüttelt. Anschließend werden die Zellen 3x mit je 1 ml Puffer gewaschen und in 0.1 ml Puffer resuspendiert. 0.1 ml Fluoreszein gekoppeltes Anti-Kaninchen-Globulin (1:10 in Puffer verdünnt) wird zugegeben, gemischt und erneut 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x je 1 ml) werden die Zellen in 0.1 ml Puffer suspendiert. 1 Tropfen der Zellsuspension wird auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas durch vorsichtigen Druck mit dem Fingernagel fixiert (Vorsicht, um die Zellen nicht zu zerdrücken) und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Filter: vgl. Abschnitt 3.1.3).

Deckglasmethode:

Die Zellen wurden auf Deckgläsern bis zu etwa einem Drittel der Konfluenz gezüchtet (sterile Deckgläser werden mit sterilem Schliff-Fett auf dem Boden der Kulturschalen festgeklebt. Dann wird die Zellsuspension zugegeben).

Die Deckgläser (evtl. lufttrocken) werden zweimal 10 min in Puffer (PBS, D2, DMEM o.ä.) bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend werden die Deckgläser mit einem Tropfen (evtl. verdünntem) Antiserum 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Am besten legt man sie dazu in kleinen Kulturschalen in eine "feuchte Kammer" (mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Plastikbox, dicht verschlossen). Während des gesamten Prozesses dürfen die Zellen auf den Deckgläsern nie austrocknen. Dann wird dreimal für 5 min in Puffer gewaschen, pro Deckglas ein Tropfen fluoreszein-gekoppeltes Anti-Kaninchen-Serum (1:10 in Puffer verdünnt) zugegeben und erneut 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (feuchte Kammer). Nach erneutem Waschen (3x 5 min) werden die Deckgläser mit einem Tropfen einer Lösung von 9 Teilen Glycerin/1 Teil PBS auf einem Objektträger fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.8.3 Test der Antiseren auf hemmende Wirkung auf die Steigerung der intrazellulären cAMP-Spiegel

Nach Absaugen des Wachstumsmediums und zweimaligem Waschen des Zellrasens mit kaltem D2 werden die Platten 30 min mit dem verdünnten Antiserum (in D2) bei 4°C inkubiert, dann 2x mit warmem Inkubationsmedium gewaschen, wie üblich (Abschnitt 3.4.3) mit den Zusätzen inkubiert und der intrazelluläre cAMP-Gehalt bestimmt. Die Bindung des Antikörpers wird in Replikaplaten durch indirekten Fluoreszenztest (Abschnitt 3.8.2, Deckglasmethode) nachgewiesen.

3.9 Gewinnung von Anti-Phenoxybenzamin-Antikörpern

Das in den unten beschriebenen Versuchen verwendete ³H-Phenoxybenzamin wurde für uns vom Radiochemical Centre, Amersham, nach der Methode von Mendelson und Mitarbeitern (307) synthetisiert. Die benötigten Vorstufen (m-Bromobenzylalkohol und N-(Phenoxyisopropyl)äthanolamin) wurden uns von Dr. W.L. Mendelson, Smith, Kline and French Laboratories, Philadelphia, U.S.A. zur Verfügung gestellt.

3.9.1 Herstellung von Phenoxybenzamin-Albumin-Konjugaten

3.9.1.1 Kopplung von Phenoxybenzamin an Glutathion; Charakterisierung des Reaktionsproduktes durch Aminosäureanalyse und Dünnschichtchromatographie.

12 mg Glutathion werden in entgastem dest. Wasser unter Stickstoff gelöst. 12 mg Phenoxybenzamin in 200 μ l Alkohol werden zugetropft und anschließend soviel Alkohol zugegeben, daß eine klare Lösung entsteht. Der pH-Wert wird mit 0.2 N Natronlauge auf 7-8 eingestellt und die Mischung unter durchperlendem Stickstoff 3 h bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert wird dabei mit 0.2 N Natronlauge zwischen 7 und 8 gehalten.

Entweder die Glutathion-Lösung oder die Phenoxybenzamin-Lösung enthält 50 μ Ci der entsprechenden radioaktiven Substanz. Zur Analyse der Reaktionsprodukte werden 10 μ l des Ansatzes auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator aufgetragen und in n-Butanol/Eisessig/Wasser 12:3:5 aufsteigend chromatographiert. In beiden Versuchen findet sich die Hauptmenge der Radioaktivität (ca. 70%) in einem neuen fluoreszenzlöschenden Fleck mit einem Rf-Wert von 0.52. Die Phenoxybenzamin entsprechende Fluoreszenzlöschung ist verschwunden.

Zur weiteren Charakterisierung des Reaktionsproduktes wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt. 5 μ l des Ansatzes wurden mit Perameisensäure oxidiert und mit Methansulfonsäure hydrolysiert. Die Verfahren waren in allen Einzelheiten identisch zu den von Spieß beschriebenen (308). Die folgende Analyse des Aminosäuregemisches wurde für uns von Herrn Dr. Spieß und Herrn Engeser (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt (Aminosäureanalysator mit angeschlossenen Integrator, System I, Biotronik). Das erhaltene Aminosäure-Verhältnis CysSO₃H: Gly:Glu betrug 0.37:1:1. Eine entsprechende Kontrollanalyse von underivatisiertem Glutathion ergab ein Verhältnis

von 1:1:1 für die 3 Aminosäuren. Das phenoxybenzamin-gekoppelte Cystein konnte im normalen Programmablauf des Aminosäureanalysators nicht von der Ionenaustauschersäule eluiert werden.

Nach den Ergebnissen der dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen und der Aminosäureanalyse scheint eine kovalente Kopplung von Phenoxybenzamin über die SH-Gruppe des Cysteinrests im Glutathion kaum noch zweifelhaft.

3.9.1.2 Einführung von zusätzlichen SH-Gruppen in Serumalbumin nach (302).

600 mg Kaninchen-Serumalbumin (RSA) werden in 10 ml 0.1 M Borat-Puffer pH 8.0 (entgast) gelöst und der pH-Wert mit 1 N Natronlauge sorgfältig auf 8.0 nachgestellt. Dann wird mit Borat-Puffer auf 13 ml verdünnt, gerührt und Stickstoff eingeleitet. Unter stetem Rühren und Stickstoffeinstrom werden 176 mg (1 mMol) S-Acetylmercaptobornsteinsäureanhydrid (SAMSA) langsam in kleinen Portionen zugegeben (Dauer: 1 h). Die resultierende Mischung wird 48 h bei 0°-4°C gegen 0.15 M Natriumchlorid/ 20 mM Borat pH 8.0 (BBS) dialysiert (2x Wechsel des Dialysepuffers). Ein während der Inkubation ausfallender Niederschlag löst sich während der Dialyse zum größten Teil wieder. Vom Ungelösten wird abzentrifugiert und die Lösung des derivatisierten Proteins (SAMSA-RSA) mit BBS auf 0.2 mM verdünnt. Nach unseren Erfahrungen scheint das Produkt auch bei -20°C nicht über längere Zeit stabil zu sein. Zur Freisetzung der SH-Gruppen wird unter Rühren und Stickstoffeinstrom der pH-Wert der Lösung für 1 bis 5 h auf 11.5 gehalten (1 N Natronlauge).

3.9.1.3 Kopplung von Phenoxybenzamin an Serumalbumin oder Polylysin.

Das nach 3.9.1.1 hergestellte Glutathionyl-Phenoxybenzamin wurde analog 3.5.3.1.1 unter Verwendung von Carbodiimid an Serumalbumin oder Polylysin gekoppelt (ca. 50 uMol pro Ansatz). Die Reaktion wurde in 50% Alkohol durchgeführt und die Produkte erst gegen 50% Alkohol (24 h) und dann gegen PBS dialysiert. In mehreren Ansätzen blieben in beiden Fällen nur etwa 2-5 Mol Phenoxybenzamin/Mol gebunden. Die Produkte wurden wegen der geringen Bindung nicht weiter untersucht und auch nicht zur Immunisierung verwendet.

Das für die Immunisierung verwendete Konjugat wurde wie folgt hergestellt:

2 uMol SAMSA-RSA in 10 ml BBS (nach Abschnitt 3.9.1.2 frisch hergestellt) werden unter Rühren und Stickstoffeinstrom 1-3 h bei pH 11.5 gehalten (1 N NaOH; pH-Meter). Dann wird mit 4 N HCl neutralisiert, ein gleiches Volumen an Alkohol zugegeben und anschließend eine Lösung von 15.3 mg (50 uMol) Phenoxybenzamin und 8×10^6 cpm ^3H -Phenoxybenzamin in 5 ml Alkohol zugetropft. Die Mischung wird 2-3 h bei Raumtemperatur unter Stickstoffdurchstrom gerührt und der pH-Wert durch Zugabe von 0.2 N Natronlauge zwischen 6.5 und 7.0 gehalten. Anschließend wird die Mischung mit 1 N Salzsäure auf pH 5.0 gebracht, das präzipitierte Protein abzentrifugiert und die im Überstand befindliche Radioaktivität gemessen. Das Protein wird in 1-2 ml Wasser suspendiert und bei neutralem pH-Wert (Einstellung mit 1 N Natronlauge) wieder in Lösung gebracht. Anschließend wird unter heftigem Rühren das fünffache Volumen an Aceton zugetropft und der pH-Wert wieder auf 5.0 gebracht (0.1 N Salzsäure). Das ausgefallene Protein wird abzentrifugiert und die Acetonextraktion noch zweimal wiederholt. Anschließend wird das Protein in 10 ml BBS gelöst und 24 h gegen BBS sowie 12 h gegen PBS dialysiert.

Eine nach der Dialyse verbleibende geringe Menge unlöslichen Materials wird abzentrifugiert und verworfen. 10-20 Mol Phenoxybenzamin wurden pro Mol Protein gebunden. Höhere Kopplungen können durch Erhöhung des Phenoxybenzamin-gehaltes im Ansatz erzielt werden. Nach unseren Erfahrungen ist das entstehende Konjugat dann jedoch nicht mehr löslich.

3.9.1.⁴ Gewinnung und Test der Anti-Phenoxybenzamin-Antiseren

Das nach Abschnitt 3.9.1.3 hergestellte Konjugat aus Phenoxybenzamin und Kaninchen-Serumalbumin (POBA-SAMSA-RSA) wird auf eine Konzentration von 1 mg/ml mit PBS verdünnt, mit dem gleichen Volumen an Freund'schen Adjuvans emulgiert und wie in Abschnitt 3.5.3.2 beschrieben, injiziert. 10 Kaninchen wurden nach dem folgenden Protokoll immunisiert:

Tag	Antigen	Adjuvans	Applikation
1	1 mg	komplett	i.c., i.c.
36(41)	1 mg	inkomplett	s.c.
115(127)	1 mg	1/4 komplett + 3/4 komplett	s.c.
156(168)	1 mg	komplett	s.c.

Testblutungen (10 ml aus der Ohrvene) erfolgten an den Tagen 52(61), 127(139), 166(178). Die Zahlen in Klammern beziehen sich jeweils auf 3 Kaninchen, die aus technischen Gründen etwas früher immunisiert wurden als die restlichen 7. Der Test der Seren auf Gehalt an Phenoxybenzamin bindenden Antikörpern erfolgt analog der im Abschnitt 3.5.3.3 für die Anti-Enkephalin-Seren beschriebenen Methode. 16 000 cpm ³H-Phenoxybenzamin wurden eingesetzt. Die Ansätze werden mit Ammoniumsulfatlösung ausgefällt. Ein Absaugen über Membranfilter ist nicht möglich, da Phenoxybenzamin stark an die Filter bindet. Von den 10 immunisierten Kaninchen hatte eines ein Serum von brauchbarem Titer (25 bei der ersten Testblutung).

3.9.1.5 Anreicherung der Anti-Phenoxybenzamin-Antikörper

8 ml des Antiserums werden unter Rühren im Eis mit 6.3 ml einer kalt-gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung versetzt (Endsättigung 44%) und noch 5 h im Eis weitergerührt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, 3x mit 44% gesättigter kalter Ammonsulfat-Lösung gewaschen, in 2 ml 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7.5 gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert (40 h, 2x Wechsel). Die Lösung wird auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sephadex A50-Säule (1.8 x 20 cm) aufgetragen und die γ -Globuline mit dem gleichen Puffer herausgewaschen (Laufgeschwindigkeit 10 ml/h, Fraktionsvolumen 2 ml). 100 μ l aus jeder zweiten Fraktion werden mit 100 μ l ^3H -Phenoxybenzamin in 50 mM Tris HCl 4mM EDTA pH 7.5/0.1% BSA (16000 cpm) in Eppendorf-Plastikreaktionsgefäßen gemischt und 2 h im Eis inkubiert. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgt wie in Abschnitt 3.5.3.3 beschrieben (Ammoniumsulfat-Methode). Die phenoxybenzamin-bindende Aktivität enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, das Protein mit Ammoniumsulfat bei 44% der Sättigung ausgefällt, in PBS gelöst und erst gegen PBS (5 l, über Nacht), dann gegen DMEM (3 l, 5 h) dialysiert (4°C). Ein kleiner Teil der Lösung wird statt gegen DMEM gegen Tris/HCl 50 mM pH 7.5/0.1% BSA dialysiert und anschließend zur Bestimmung der Ausbeute auf Phenoxybenzamin bindende Aktivität getestet.

3.9.1.6 Test der Anti-Phenoxybenzamin-Antikörper auf Bindung an zellgebundenes Phenoxybenzamin durch indirekte Immunfluoreszenz.

Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen werden in kleinen Kulturschalen (35 mm Durchmesser) bis etwa zu 1/3 der Konfluenz auf Deckgläsern gezüchtet. Die Zellen werden mit

Inkubationsmedium (175) gewaschen und anschließend 30 min mit 10^{-6} bzw. 10^{-4} M Phenoxybenzamin in Inkubationsmedium (1 ml) bei 37°C im CO_2 -Inkubator inkubiert. Anschließend wird 2x mit Inkubationsmedium gewaschen. Die Deckgläser werden entnommen und mit je einem Tropfen Anti-Phenoxybenzamin-Antikörperlösung in DMEM (siehe Abschnitt 3.9.1.5) in einer feuchten Kammer 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte werden, wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, durchgeführt. Als negative Kontrolle dient Kaninchen- γ -Globulin, das auf den gleichen Proteingehalt wie die Antikörper-Lösung eingestellt wurde, als positive Kontrolle Anti-108CC15-Serum (1:10 verdünnt, siehe Abschnitt 3.8).

3.10 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et. al (309) mit Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt.

4. Zusammenfassung

1.) Die Verwendbarkeit von Primärkulturen des Gehirns als Ausgangssystem zur Gewinnung einheitlicher Subpopulationen untransformierter Hirnzellen wurde untersucht. Als Modellsystem für diese Untersuchungen dienten anreicherte Kulturen nicht-neuronaler Hirnzellen. Die in den gemischten Kulturen vertretenen Zelltypen wurden wie folgt charakterisiert:

a) β -adrenerge Agonisten, Adenosin, Histamin und E-Prostaglandine erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel in den Kulturen. Hemmstudien mit spezifischen Antagonisten zeigen die Vermittlung der Effekte über eine Stimulierung der entsprechenden Rezeptoren.

b) Die Erhöhung der cAMP-Spiegel durch β -adrenerge Agonisten wird durch α -adrenerge Agonisten, Adenosin, Histamin und H₁-Agonisten gehemmt. Die durch PGE₁ gesteigerten cAMP-Spiegel werden dagegen nicht beeinflusst. Hemmstudien zeigen die Vermittlung der Effekte der α -Agonisten über einen α -Rezeptor. Die Natur der inhibitorischen Adenosin- und Histamin-Effekte konnte noch nicht eindeutig geklärt werden.

c) Die Ergebnisse zeigen, daß Untersuchungen dieser Art die Zuordnung eines bestimmten Satzes von Rezeptoren zu einem Zelltyp auch in gemischten Kulturen ermöglichen. Ein Großteil der Zellen in den Kulturen besitzt mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl α -als auch β -adrenerge Rezeptoren. Die Zuordnung der stimulatorischen und inhibitorischen Effekte von Adenosin und Histamin zu bestimmten Zelltypen wird diskutiert. Die Kenntnis einer solchen Kombination von Hormonrezeptoren kann zur Identifizierung des entsprechenden Zelltyps dienen. Damit erscheint eine gerichtete und spezifische Anreicherung von Zellen möglich.

- 2.) Im Gegensatz zu den Primärkulturen - einem Modellsystem untransformierter Gliazellen - zeigen Ratten-Gliomazellen C6 lediglich nach Inkubation mit β -adrenergen Agonisten und PGE_1 einen erhöhten cAMP-Gehalt. Adenosin, Histamin und eine Reihe weiterer Substanzen haben keinen Effekt. Weder α -adrenerge Agonisten noch Histamin noch Adenosin hemmen die β -adrenerg gesteigerten cAMP-Spiegel in den Gliomazellen. Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Hormonsensitivität in beiden Glia-Modellsystemen werden diskutiert.
- 3.) Effekte auf den cGMP-Gehalt der Zellen wurden weder bei den Primärkulturen noch bei C6-Gliomazellen gefunden.
- 4.) Die Verwendbarkeit rezeptor-spezifischer Antikörper zur Anreicherung von Zellen aus gemischten Kulturen wurde untersucht. Ein auch in Normalseren verschiedener Spezies sowie in foetalem Kalbsserum vorkommender Faktor, der den Test der Antiseren stört, wird beschrieben.
 - a) Der Faktor hemmt die Steigerung der cAMP-Spiegel durch β -adrenerge Agonisten und PGE_1 in Zellkulturen.
 - b) Die Hemmwirkung ist reversibel und nicht kompetitiv.
 - c) Der Faktor ist nicht dialysierbar, adsorbiert an Holzkohle, ist hitze-, säure- und alkalistabil und pronase-resistent.
- 5.) Techniken zur Untersuchung von Enkephalin-Biosynthese und Synapsenbildung in Primärkulturen neuronaler Zellen wurden ausgearbeitet.
- 6.) Eine "Hapten-Sandwich"-Technik zur Isolierung affinitätsmarkierter Zellen wird vorgeschlagen und über erste Versuche zu ihrer Realisierung berichtet.

5. Literaturverzeichnis

1. Jacob, F. und Monod, J., Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 26, 193-211 (1961)
2. Greaves, M.F., in: Cuatrecasas, P. und Greaves, M.F. (Herausgeber), Receptors and Recognition, Series A, 1, 1-33, Chapman and Hall, London (1976)
3. Wigzell, H. und Häyry, P. in: Current topics in Microbiol. and Immunol. 67, 1-42, Springer Verlag, Heidelberg, N.Y. (1976)
4. Blomstrand, C. und Hamberger, A., J. Neurochem. 17, 1187-1195 (1970)
5. Capps-Covey, P. und McIlwain, D.L., J. Neurochem. 25, 517-521 (1975)
6. Hamberger, A., Eriksson, O. und Nörrby, K., Exp. Cell Res. 67, 380-388 (1971)
7. Iqbal, K. und Tellez-Nagel, I., Brain Res. 45, 296-301 (1972)
8. Nagata, Y., Mikoshiba, K. und Tsukada, Y., J. Neurochem. 22, 493-503 (1974)
9. Norton, W.T. und Poduslo, S.E., Science 167, 1144-1146 (1970)
10. Poduslo, S.E. und Norton, W.T., in: Lowenstein, J.M. (Herausgeber), Methods in Enzymology, Vol. 35, 561-579 Academic Press, N.Y. (1975)
11. Rose, S. R., Biochem. J. 102, 33-43 (1967)
12. Sellinger, O. Z. und Azcurra, J. M., in: Marks, N. und Rodnight, R. (Herausgeber), Research Methods in Neurochem., Vol. 2, 3-38 Plenum Press, N.Y. (1974)
13. Farooq, M., Ferszt, R., Moore, C.L. und Norton, W.T., Brain Res., 124, 69-81 (1977)
14. Sellström, A., Sjöberg, L.B. und Hamberger, A., J. Neurochem. 25, 393-398 (1975)

15. Wilkin, G.P., Balazs, R., Wilson, J.E., Cohen, J. und Dutton, G.R., *Brain Res.*, 115, 181-199 (1976)
16. de Robertis, E.D.P. und Carrea, R. (Herausgeber), *Progress in Brain Research*, Vol. 15, *Biology of Neuroglia*, Elsevier Publishing Company (1965)
17. Glees, P., in: *Neuroglia, morphology and function*, Blackwell Scientific Public., Oxford (1955)
18. Kuffler, S.W., "The Ferrier Lecture", *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B.* 168, 1-21 (1967)
19. Schrier, B.K. und Thompson, E.J., *J. Biol. Chem.* 249, 1769-1880 (1974)
20. Buonassi, V., Sato, G. und Cohen, A.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48, 1184-1190 (1962)
21. Yamamura, Y., Tashjian, A.H. jr. und Sato, G., *Science* 154, 1186 - 1189 (1966)
22. Augusti-Tocco, G. und Sato, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 64, 311-315 (1969)
23. Katsuta, H. und Takaota, T., in: Prescott, D.M. (Herausgeber), *Methods in Cell Biology*, VI, 1-42, Academic Press., N.Y., London (1973)
24. Hamprecht, B., *Angew. Chem.* 33, 211-223 und *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* 15, 194-206 (1976)
25. Hamprecht, B., *Intern. Rev. Cytol.* 49, 99-170 (1977)
26. Breakefield, X.O., *Life Sci.* 18, 267-278 (1976)
27. Perkins, J.P., Mac Intyre, E.H., Riley, W.D. und Clark, R.B., *Life Sci.* 10, 1069-1030 (1971)
28. Clark, R.B. und Perkins, J.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 68, 2757-2760 (1971)
29. Clark, R.B., Gross, R., Su, Y.-F. und Perkins, J.P., *J. Biol. Chem.* 249, 5296-5303 (1974)

30. Clark, R.B., Su, Y.-F., Ortmann, R., Cubeddu, X.L., Johnson, G.L. und Perkins, J.P., *Metabolism* 24, 343-358 (1975)
31. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. und Sweet, W., *Science* 161, 370-371 (1968)
32. Gilman, A.G. and Nirenberg, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68, 2165-2168 (1971)
33. Hamprecht, B. und Schultz, J., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1633-1641 (1973)
34. Schultz, J., Hamprecht, B. und Daly, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 1266-1270 (1972)
35. Hamprecht, B., Jaffe, B.M. und Philpott, G.W., *FEBS-lett.* 36, 193-198 (1973)
36. Hamprecht, B., Kemper, W. und Amano, T., *Brain Res.* 101, 129-135 (1976)
37. Amano, T., Hamprecht, B. und Kemper, W., *Exp. Cell Res.* 85, 399-408 (1974)
38. De Vellis, J. und English, D., *J. Neurochem.* 15, 1061-1070 (1968)
39. De Vellis, J. und Brooker, G., in: Sato, G. (Herausgeber), *Tissue culture of the nervous system*, 231-245, Plenum Press. N.Y., London (1973)
40. Eng, L., Vanderhagen, J.J., Bignami, A. und Gerstl, B., *Brain Res.* 28, 351-354 (1971)
41. Bissell, M.G., Rubinstein, L.J., Bignami, A. und Herman, M.M., *Brain Res.* 82, 77-79 (1974)
42. Bissell, M.G., Eng, L.F., Herman, M.M., Bensch, K.G. and Miles, L.E.M., *Nature* 255, 633-634 (1975)
43. Pfeiffer, S.E. und Wechsler, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 2885-2889 (1972)
44. Nelson, P., *Physiol. Rev.* 55, 1-61 (1975)

45. Lumsden, C.E., in: Bourne, G.H. (Herausgeber), *The Structure and Function of Nervous Tissue*, Vol. 1, S. 67-140, Academic Press, N.Y. and London (1968)
46. Murray, M.R. in: Lagtha, A. (Herausgeber), *Handbook of Neurochemistry*, 5 A, S. 373-438, Plenum Press N.Y. (1971)
47. Schneider, J.F. in: Fried, R. (Herausgeber), *Methods in Neurochemistry*, Vol. 4, 1-68, Marcel Dekker Inc. N.Y. (1973)
48. Hershman, H.R. in: Marks, N. und Rodnight, R. (Herausgeber), *Research Methods in Neurochemistry*, Vol. 2, 101-160 (1974)
49. Seamer, J., *Br. J. exp. Path.* 55, 606-614 (1974)
50. Wilkinson, M., Gibson, C.J., Bressler, B.H. und Inman, D.R., *Brain Res.* 82, 129-138 (1974)
51. Lodin, Z., Booher, J. und Kasten, F.H., *Exp. Cell Res.* 59, 291-298 (1970)
52. Booher, J., Hertz, L. und Lodin, Z., *Neurobiol.* 1, 27-31 (1971)
53. Faltin, J., Lodin, Z. und Booher, J., *Acta histochem.* 50, 187-199 (1974)
54. Luduena, M., *Develop. Biol.* 33, 470-476 (1973)
55. Scott, B.S., Engelbert, V.E. und Fisher, K.C., *Exp. Neurol.* 23, 230-248 (1969)
56. Scott, B.S. und Fisher, K.C., *Exp. Neurol.* 27, 16-22 (1970)
57. Scott, B.S. und Fisher, K.C. *Exp. Neurol.* 31, 183-188 (1971)
58. Scott, B.S. *Exp. Neurol.* 30, 297-308 (1971)
59. Okun, L.M., Outkhan, F.K. und Thomas, C.A. *Exp. Cell Res.* 73, 226-229 (1972)

60. Varon, S. und Raiborn, C.W., J. Neurocytol. 1, 211-221 (1972)
61. Shahar, A. und Saar, M., Brain Res. 23, 315-321 (1970)
62. Teichberg, S. und Holtzman, E., J. Cell Biol. 57, 88-108 (1973)
63. Miller, R., Varon, S., Kruger, L., Coates, P.W. und Orkand, P.M., Brain Res. 24, 356-358 (1970)
64. Waxman, S.G., Dichter, M.A., Hartwig, E.A. und Matheson, J.K., Brain Res. 122, 344-350 (1977)
65. Varon, S., Raiborn, C. und Burnham, P.A., Neurobiol. 4, 231-252 (1974)
66. Burnham, P., Raiborn, C. und Varon, S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 3556-3560 (1972)
67. Varon, S., Raiborn, C. und Burnham, P., J. Neurobiol., 5, 355-372 (1974)
68. Levi-Montalcini, R. und Angeletti, P.U., Develop. Biol. 7, 653-659 (1963)
69. Bray, D., J. Cell. Biol. 56, 702-712 (1973)
70. Bray, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 165, 905-910 (1970)
71. Lodin, Z., Booher, J. und Kasten, F.H., Exp. Cell. Res. 60, 27-39 (1970)
72. Yamada, K.M. und Wessels, N.K., Exp. Cell. Res. 66, 346-352 (1971)
73. Tennyson, V.M., J. Cell. Biol. 44, 62-69 (1970)
74. Luduena, M.A. und Wessels, N.K., Develop. Biol. 30, 427-440 (1973)
75. Bray, D., Nature 244, 93-95 (1973)
76. Bunge, M.B., J. Cell. Biol. 56, 713-735 (1973)
77. Fine, R.E. und Bray, D., Nature, New. Biol. 234, 115-118 (1971)

78. Daniels, M.P., J. Cell. Biol. 53, 164-176 (1972)
79. England, J.M., Kadin, M.E. und Goldstein, M.N. J. Cell. Sci. 12, 549-565 (1973)
80. Yamada, K.M., Spooner, B.S. und Wessels, N.K., J. Cell. Biol. 49, 614-635 (1971)
81. Okun, L.M., J. Neurobiol. 3, 111-151 (1972)
82. Varon, S. und Raiborn, C.W., Brain Res. 30, 83-98 (1971)
83. Bunge, R.P., Ress, R., Wood, P., Burton, H. und Ko, C-P. Brain Res. 66, 401-412 (1974)
84. Peacock, J.H., Nelson, P.G. und Goldstone, M.W. Develop. Biol. 30, 137-152 (1973)
85. Chalazonitis, A., Greene, L.A. und Nirenberg, M. Brain Res. 68, 235-252 (1974)
86. Lawson, S.N. und Biscoe, T.J., J. Cell. Physiol. 82, 285-298 (1973)
87. O'Lagne, P.H., MacLeish, P.R., Nurse, C.A., Claude, P. Furshplan, E. J. und Potter, D.D., Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. XL, 399-407 (1976)
88. Obata, K., Brain Res. 73, 71-83 (1974)
89. Fischbach, G.D. and Dichter, M.A., Develop. Biol. 37, 100-116 (1974)
90. McCarthy, K.D. und Partlow, L.M., Brain Res. 114, 391-414 (1976)
91. Mains, E.R. und Patterson, P.H., J. Cell. Biol. 59, 329-345 (1973)
92. Patterson, P.H. und Chun, L.L.Y., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 3607-3610 (1974)
93. McCarthy, K.D. und Partlow, L.M., Brain Res. 114, 415-426 (1976)

94. Patterson, P.H., Reichardt, L.F. und Chun, L.L.Y.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. XL, 389-397
(1976)
95. Ciesielski-Treska, J., Hermetet, J.C. und Mandel, P.,
Histochemie 23, 36-43 (1970)
96. Hermetet, J.C., Treska, J. und Mandel, P.
Histochemie 22, 177-186 (1970)
97. Jacobowitz, D.M. und Green, L.A., J. Neurobiol. 5,
65-83 (1974)
98. Sanes, J.R. und Okun, L.M., J. Cell. Biol. 53,
587-590 (1972)
99. Sensenbrenner, M., Ciesielski-Treska J., Lodin, Z.
und Mandel, P., Z. Zellforsch. 106, 615-626 (1970)
100. England, J.M und Goldstein, M.N., J. Cell. Sci. 4,
677-691 (1969)
101. Burdman, J.A., J. Neurochem. 15, 1321-1323 (1968)
102. Greene, L.A., Sytkowski, A.J., Vogel, Z. und
Nirenberg, M.W., Nature 243, 163-166 (1973)
103. Mains, E.R. und Patterson, P.H., J. Cell. Biol. 59,
346-360 (1973)
104. Mains, E.R. und Patterson, P.H., J. Cell. Biol. 59,
361-366 (1973)
105. Burnham, P.A. and Varon, S., Neurobiol. 4, 57-70 (1974)
106. Fischbach, G.D., Fambrough, D. and Nelson, P.G., Fed.
Proc. 32, 1636-1642 (1973)
107. Fischbach, G.D., Henkart, M.P., Cohen, S.A., Breuer, A.C.,
Whysner, J. and Neal, F.M., 26 th Symp. Soc. Gen.
Physiol. Raven Press, New York 259-285 (1974)
108. Shimada, Y. and Fischman, D.A., Develop. Biol. 31,
200-225 (1973)

109. Greenham, L.W., Hill, T.J., Moss, C.A. und Peacock, D.B.,
Exp. Cell. Res. 84, 287-299 (1974)
110. Yavin, E. und Menkes, J.H., J. Cell. Biol. 57, 232-
237 (1973)
111. Booher, J. und Sensenbrenner, M., Neurobiol. 2, 97-
105 (1972)
112. Varon, S. und Raiborn, C.W., Brain Res., 12, 180-199
(1969)
113. Sensenbrenner, M., Booher, J. und Mandel, P., Z. Zell-
forsch. 117, 559-569 (1971)
114. Shein, H.M., Exp. Cell. Res. 40, 554-560 (1965)
115. Lasher, R.S. und Zagon, I.S., Brain Res. 41, 482-488
(1972)
116. Nelson, P.G. und Peacock, J.H., Brain Res. 61, 163-
174 (1973)
117. Wilson, S.H., Schrier, B.K., Farber, J.L., Thompson, E.J.,
Rosenberg, R.N., Blume, A.J. und Nirenberg, M.W.,
J. Biol. Chem. 247, 3159-3169 (1972)
118. Werner, I., Peterson, G.R. und Shuster, L., J. Neuro-
chem. 18, 141-151 (1971)
119. Schrier, B.K., J. Neurobiol. 4, 117-124 (1973)
120. Breen, G.M. und de Vellis, J., Develop. Biol. 41,
255-266 (1974)
121. Sensenbrenner, M. and Mandel, P., Exp. Cell. Res. 87,
159-167 (1974)
122. Yavin, E. und Yavin, Z., J. Cell. Biol., 62, 540-546
(1974)
123. Sensenbrenner, M., Jaros, G.G., Moonen, G. and
Mandel, P., Neurobiol. 5, 207-213 (1975)
124. Merrell, R., Pulliam, M.W., Randono, L., Boyd, L.F.,
Bradshaw, R.A. und Glaser, L., Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S. 72, 4270-4274 (1975)

125. Murphy, W.H. und Bullis, C., Proc. soc. exp. biol. med. N.Y. 142, 1-6 (1973)
126. Björklund, A. und Stenevi, U., Science 175, 1251-1253 (1972)
127. Berger, B.D., Wise, C.D. und Stein, L., Science 180, 506-508 (1973)
128. Athias, P., Sensenbrenner, M. und Mandel, P., Differentiation 2, 99-106 (1974)
129. Sensenbrenner, M., Springer, N., Booher, J. und Mandel, P., Neurobiol. 2, 49-60 (1972)
130. Lim, R., Mitsunobu, K. und Li, W.K., Exp. Cell. Res. 79, 243-246 (1973)
131. Lim, R. und Mitsunobu, K., Science 185, 63-66 (1974)
132. Shapiro, D.L., Nature 241, 203-204 (1973)
133. Bornstein, M.B. und Model, P.G., Brain Res. 37, 287-293 (1972)
134. Crain, S.M. und Bornstein, M.B., Science 176, 182-184 (1972)
135. Petersen, G.R., Webster, G.W. und Shuster, L., Develop. Biol. 34, 119-134 (1973)
136. Ebel, A., Massarelli, R., Sensenbrenner, M. und Mandel, P., Brain Res. 76, 461-472 (1974)
137. Shapiro, D.L. und Schrier, B.K., Exp. Cell. Res. 77, 239-247 (1973)
138. Schrier, B.K. und Shapiro, D.L., Exp. Cell. Res. 80, 459-462 (1973)
139. Schrier, B.K. und Shapiro, D.L., J. Neurobiol. 5, 151-159 (1974)
140. Seeds, N.W., J. Biol. Chem. 250, 5455-5458 (1975)
141. Seeds, N.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1858-1861 (1971)

142. Gilman, A.G. und Schrier, B.K., Mol. Pharmacol. 8, 410-416 (1972)
143. Breen, G.A.M., de Vellis, J. und Cole, R. "Transactions of the Third Meeting of the Society for Neuroscience", 427, San Diego (1973)
144. Seeds, N.W. und Gilman, A.G., Science, 174, 292 (1971)
145. de Vellis, J., Schjeide, O.A. und Clemente, C.D., J. Neurochem. 4, 499-511 (1967)
146. Bock, E., Jørgensen, O.S., Dittmann, L. und Eng, L.F., J. Neurochem. 25, 867-870 (1975)
147. Schousboe, A., Fosmark, H. und Svenneby, G., Brain Res. 116, 158-164 (1976)
148. Schousboe, A., Fosmark, H. und Hertz, L., J. Neurochem. 25, 909-911 (1975)
149. Dittmann, L., Sensenbrenner, M., Hertz, L. und Mandel, P., J. Neurochem. 21, 191-198 (1973)
150. Schousboe, A., Fosmark, H. und Formby, B., J. Neurochem. 26, 1053-1055 (1976)
151. Hertz, L., Svenneby, G. und Schousboe, A., Trans.Amer. Soc. Neurochem. 7, 192 (1976)
152. Hertz, L., Dittmann, L. und Mandel, P., Brain Res. 60, 517-520 (1973)
153. Mandel, P., Stevanovic, V., Ciesielski-Treska, J. und Ebel, A., FEBS-Lett. 45, 337-339 (1974)
154. Robert, J., Freysz, L., Sensenbrenner, M., Mandel, P. und Rebel, G., FEBS-Lett. 50, 144-146 (1975)
155. Latzkovits, L., Sensenbrenner, M. und Mandel, P., J. Neurochem. 23, 193-200 (1974)
156. Goridis, C., Massarelli, R., Sensenbrenner, M. und Mandel, P., J. Neurochem. 23, 135-138 (1974)

157. Faivre-Baumann, A., Rossier, J. und Benda, P., Brain Res. 76, 371-375 (1974)
158. Hutchison, H.T., Werrbach, K., Vance, C. und Haber, B., Brain Res. 66, 265-274 (1974)
159. Kimelberg, H.K., J. Neurochem. 22, 971-976 (1974)
160. Martin, R.G. und Chou, J.Y., J. Virol. 15, 599-612 (1975)
161. Tegtmeyer, P., J. Virol. 15, 613-618 (1975)
162. Osborn, M. und Weber, K., J. Virol. 15, 636-644 (1975)
163. Brugge, J.S. und Butel, J.S., J. Virol. 15, 619-635 (1975)
164. Sutherland, E.W. und Rall, T.W., J. Biol. Chem. 232, 1077-1091 (1958)
165. Robison, G.A., Butcher, R.W. und Sutherland, E.W., Cyclic AMP, Academic Press. N.Y., London (1971)
166. Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M. und Price, T.D., Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 330-334 (1963)
167. Anderson, W.B. und Pastan, I., Advances in Cyclic Nucleotide Research 5, 681-698 (1975)
168. Bloom, F.E., Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 15, 273-282 (1976)
169. Sutherland, E.W., Øye, I. und Butcher, R.W., Rec. Progr. Horm. Res. 21, 623-646 (1965)
170. Goldberg, N.D., Haddox, M.K., Hartle, D.K. und Hadden, J.W., Pharmacology and the Future of Man, Proc. 5th. Int. Congr. Pharm. San Franzisco, 1972, Vol. 5, 146-169, Karger, Basel (1973)
171. Goldberg, N.D., Haddox, M.K., Nicol, S.E., Glass, D.B., Sanford, C.H., Kuehl, F.A. und Estensen, R., Advances in Cyclic Nucleotide Research 5, 307-330 (1975)

172. Bloch, A., *Advances in Cyclic Nucleotide Research*
Vol. 5, 331-338 (1975)
173. Bloom, F.E., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 74,
1-103, Springer Verlag Heidelberg, New York (1975)
174. Gilman, A.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 67,
305-312 (1970)
175. Traber, J., *Dissertation, Universität München* (1976)
176. Wunderwald, P., Heinze, R., Deneke, U., van Calker, D.,
Gullis, R.J., Traber, J. und Hamprecht, B., *Aktuelle
Biochemie - Kundenzeitschrift der Boehringer/Mannheim
GmbH, Tutzing* (1976)
177. Kuo, J.F. und Greengard, P., *J. Biol. Chem.* 245,
2493-2498 (1970)
178. Kuo, J.F., Wyatt, G.R. und Greengard, P., *J. Biol.
Chem.* 246, 7159-7167 (1971)
179. Heumann, R. und van Calker, D., *unveröffentlicht*
180. Villegas, J. und van Calker, D., *unveröffentlicht*
181. Reiser, G. und Heumann, R., *unveröffentlicht*
182. Goodman, L.S. und Gilman, A. (Herausgeber), *The
Pharmacological Basis of Therapeutics*, McMillan,
London (1970)
183. Schultz, J. und Hamprecht, B., *Naunyn Schmiedebergs
Arch. Pharmacol.* 278, 215-225 (1973)
184. Hamprecht, B. und Schultz, J., *FEBS-lett.* 34, 85-89
(1973)
185. Traber, J., Reiser, G., Fischer, K. und Hamprecht, B.,
FEBS-lett. 52, 327-332 (1975)
186. Jakobs, K.H., Saur, W. und Schultz, G., *J. Cycl. Nucl.
Res.* 2, 381-392 (1976)
187. Schultz, G., Hardman, J.G., Schultz, K., Davies, J.
und Sutherland, E.W., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70,
1721-1725 (1973)

188. Glass, D.B., White, J.G. and Goldberg, N.D., Fed. Proc. 33, 611 (1974)
189. Gullis, R., unveröffentlicht
190. Hoffmann-La Roche AG, unveröffentlicht
191. Gullis, R., Traber, J., Fischer, K., Buchen, C. und Hamprecht, B., FEBS-lett. 59, 74-79
192. Gullis, R.J., Buchen, C., Moroder, L., Wunsch, E. und Hamprecht, B. in: Kosterlitz, H.W. (Herausgeber), Opiates and endogenous opioid peptides, 143-151, Elsevier, Amsterdam (1976)
193. Brand, M., Gullis, R., Fischer, K., Buchen, C., Hamprecht, B., Moroder, L. und Wunsch, E., Nature 262, 311-313 (1976)
194. Gullis, R., Traber, J. und Hamprecht, B., Nature 256, 57-59 (1975)
195. Hamprecht, B., Nature 265, 764, (1977)
196. Gullis, R., Nature 265, 764 (1977)
197. Daly, J.W., Life Sci. 18, 1349-1358 (1976)
198. Batzri, S., Selinger, Z. und Schramm, M., Science 174, 1029-1031 (1971)
199. Hutson, N.J., Brumley, F.T., Assimacopoulos, F.D., Harper, S.C. und Exton, J.H., J. Biol. Chem. 251, 5200-5208 (1976)
200. Cherrington, A.D., Assimacopoulos, F.D., Harper, S.C., Corbin, J.D., Park, C.R. und Exton, J.H., J. Biol. Chem. 251, 5209-5218 (1976)
201. Buonassi, V. und Venter, J.C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 73, 1612-1616 (1976)
202. Burns, T.W. und Langley, P.E., Pharmacol. Res. Comm. 3, 271-277 (1971)

203. Schimmel, R.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 428, 379-387 (1976)
204. Lafontan, M. und Agid, R., *Comp. Biochem. Physiol.*, 55, 85-90 (1976)
205. Limbird, L.E. und Lefkowitz, R.J., *J. Biol. Chem.* 251, 5007-5014 (1976)
206. Burnstock, G., *Pharmacol. Rev.* 24, 509-558 (1972)
207. Scholfield, C.N., *Pharmacologist*. 16, 242 (1974)
208. Blume, A.J., Dalton, C. und Sheppard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 70, 3099-3102 (1973)
209. Shimizu, H. und Daly, J., *Biochim. Biophys. Acta* 222, 465-473 (1970)
210. Schultz, J., *J. Neurochem.* 24, 1237-1242 (1975)
211. Sattin, A. und Rall, T.W., *Molec. Pharmacol.* 6, 13-23 (1970)
212. Huang, M. und Daly, J.W., *Life Sci.* 14, 489-503 (1974)
213. Schultz, J. und Daly, J.W., *J. Biol. Chem.* 248, 853-859 (1973)
214. Schultz, J. und Daly, J.W., *J. Biol. Chem.* 248, 860-866 (1973)
215. Mills, D.C.B. und Smith, J.B., *Biochem. J.* 121, 185-196 (1971)
216. Penit, J., Huot, J. und Jard, S., *J. Neurochem.* 26, 265-273 (1976)
217. Huang, M. und Drummond, G.I., *Biochem. Pharmacol.* 25, 2713-2719 (1976)
218. Kuroda, Y., Saito, M. und Kobayashi, K., *Brain Res.* 109, 196-201 (1976)
219. Mah, H.D. und Daly, J.W., *Pharm. Res. Comm.* 8, 65-79 (1976)

- 220. Haslam, R.J. und Rosson, G.M., *Molec. Pharmacol.* 11, 528-544 (1975)
- 221. Fain, J.N., Pointer, R.H. und Ward, W.F., *J. Biol. Chem.* 247, 6866-6872 (1972)
- 222. Fain, J.N., *Molec. Pharmacol.* 9, 595-604 (1973)
- 223. Moriwaki, K. und Foá, P.P., *Experientia* 26, 22 (1970)
- 224. Weinryb, I. und Michel, I.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 334, 218-225 (1974)
- 225. Green, R.D. und Stanberry, L.R., *Biochem. Pharmacol.* 26, 37-43 (1977)
- 226. Blume, A.J. und Foster, C.J., *J. Biol. Chem.* 250, 5003-5008 (1975)
- 227. Butcher, R.W. und Sutherland, E.W., *J. Biol. Chem.* 237, 1244-1250 (1962)
- 228. Traber, J., unveröffentlicht
- 229. Shimizu, H., Ichishita, H. und Umeda, I., *Molec. Pharmacol.* 11, 866-873 (1975)
- 230. Shimizu, H. und Yamamura, Y., *J. Neurochem.* 383-388 (1977)
- 231. Sturgill, T.W., Schrier, B.K. und Gilman, A.G., *J. cycl. Nucl. Res.* 1, 21-30 (1975)
- 232. Ash, A.S.F. und Schild, D.H., *Br. J. Pharmac. Chemother.* 27, 427-439 (1966)
- 233. Black, J. W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R. und Parsons, E.M., *Nature* 236, 385-390 (1972)
- 234. Black, J.W., Durant, G.J., Emmett, J.C. und Ganellin, C.R., *Nature* 248, 65-67 (1974)
- 235. Brimble, M.J. und Wallis, D.I., *Nature* 246, 156-158 (1973)
- 236. Carpenter, D.O. und Gaubatz, G.L., *Nature* 254, 343-344 (1975)

237. Haas, H.L., Brain Res. 76, 363-366 (1974)
238. Haas, H.L. und Wolf, P., Brain Res. 122, 269-279 (1977)
239. Haas, H.L. und Butcher, U.M., Nature 255, 634-635 (1975)
240. Schwartz, J.C., Barbin, G., Garberg, M., Pollard, H., Rose, C. und Verdiere, M., Advances in Biochemical Psychopharmacology 15, 111-126, Raven Press., N.Y. (1976)
241. Schwartz, J.C., Baudry, M., Bischoff, S., Martres, M.-P., Pollard, H., Rose, C. und Verdiere, M., in: Bradley, P.B. und Dhawan, B.N. (Herausgeber), Drugs and Central Synaptic Transmission, 371-382, The Macmillan Press Ltd., London, Basingstoke (1976)
242. Baudry, M., Martres, M.-P. und Schwartz, J.-C., Nature 253, 362-363 (1975)
243. Dismukes, K., Rogers, M. und Daly, J.W., J. Neurochem. 26, 785-790 (1976)
244. Rogers, M., Dismukes, K. and Daly, J.W., J. Neurochem. 25, 531-534 (1975)
245. Hegstrand, L.R., Kanof, P.D. and Greengard, P., Nature 260, 163-165 (1976)
246. Nahorski, S.R., Rogers, K.J. and Smith, B.M., Life Sci. 15, 1887-1894 (1975)
247. Shimizu, H., Creveling, C.R. and Daly, J.W., J. Neurochem. 17, 441-444 (1970)
248. Lindl, T. and Cramer, H., Biochim. Biophys. Acta 343, 182-191 (1974)
249. Domschke, W., Domschke, S., Classen, M. and Demling, L., Nature 241, 454-455 (1973)
250. Joó, F., Rakonczay, Z. and Wolleman, M., Experientia 31/5, 582-584 (1975)
251. Verma, S.C. und McNeill, J.H., Life Sci. 19, 1797-1802 (1976)

252. Dousa, T.P. und Code, C.F., J. Clin. Invest. 53, 334-337 (1974)
253. Durant, G.J., Ganellin, C.R. and Parsons, M.E., J. Med. Chem. 18, 905-909 (1975)
254. Roberts, E. and Simonsen, D.G., Brain Res. 24, 91-101 (1970)
255. Bökesoy, T.A. and Türker, R.K., Arch. Int. Pharmacodyn. 209, 144-149 (1974)
256. Schultz, J. and Daly, J.W., J. Biol. Chem. 248, 842-852 (1973)
257. Perkins, J.P., unveröffentlicht
258. Haslam, R.J. und Lynham, J.A., Life Sci. 11, 1143-1154 (1973)
259. Hamprecht, B., Biochemical markers in normal and neoplastic cell populations of the mammalian nervous system, U.I.C.C. workshop on Brain cancer, Genf, 1977, im Druck
260. van Cauter, E., Hardman, J.G. and Dumont, J.E., Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2982-2986 (1976)
261. Sicuteri, F., Rocha e Silva, M. und Back, N., (Herausgeber), Bradykinin and related Kinin, Plenum Press., New York-London (1970)
262. Erspamer, V., Ann. Rev. Pharmacol. 11, 327-347 (1971)
263. Leeman, S.E. und Mroz, Life Sci. 15, 2033-2044 (1975)
264. Lembeck, F., Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 219, 197-213 (1953)
265. Otsuka, M., Konishi, S. und Takahashi, T., Proc. Japan. Acad. 48, 342 (1972)
266. Hökfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G. und Pernow, B., Brain Res. 100, 235-252 (1975)

267. Soffer, R.L., Reza, R. und Caldwell, P.R.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 1720-1724 (1974)
268. Ueda, E., Kokubu, T., Akutsu, H. und Yamamura, Y., Experientia 27, 1020-1021 (1971)
269. Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Boyse, E., Schlesinger, D.H. und Niale, H.D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 11-15 (1975)
270. Bitensky, M. und Goldstein, G. in Vorbereitung
271. Scheid, M.S., Goldstein, G., Hammerling, U. und Boyse, E.A., Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 531-540 (1975)
272. Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon jun. W.D., van den Brande, J.L. und van Wyke, J.J., Nature 235, 107 (1972)
273. Salmon, jun. W.D. und Daughaday, W.H., J. Lab. Clin. Med. 49, 825-836 (1957)
274. Daughaday, W.H. und Reeder, C., J. Lab. Clin. Med. 68, 357-370 (1967)
275. Daughaday, W.H. und Maritz, I.K., J. Lab. Clin. Med. 59, 741-753 (1962)
276. Salmon, jun. W.D. und DuVall, M.R., Endocrinology 86, 721-752 (1970)
277. Tell, G.P.E., Cuatrecasas, P., van Wyk, J.J. und Hintz, R.L., Science, 180, 312-315 (1973)
278. Kosterlitz, H.W. (Herausgeber), Opiates and endogenous opioid peptides, Elsevier Amsterdam (1976)
279. Melmon, K.L., Bourne, H.R., Weinstein, J., und Sela, M., Science 177, 707-709 (1972)
280. Soderman, D.D., Gunershausen, J. und Katzen, H.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70, 792-796 (1973)
281. Venter, B., Venter, J.C. und Kaplan, N.O., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 2013-2017 (1976)

- 282. Huber, J., unveröffentlicht
- 283. Schachner, M. und Carnow, T.B., Brain Res. 88, 394-402 (1975)
- 284. Bock, E., Jorgensen, O.S. und Morris, S.J., J. Neurochem. 22, 1013-1017 (1974)
- 285. Jorgensen, O.S. und Bock, E., Neurochem. 23, 879-880 (1974)
- 286. Brookes, J.P., Fields, K.L. und Raff, M.C., Nature 266, 364-366 (1977)
- 287. Heilbronn, E. und Mattson, C., J. Neurochem. 22, 315-317 (1974)
- 288. Myers, R.R., Doulon, M., McCarthy, K., Livengood, D. und Shain, W., Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 1311-1318 (1976)
- 289. Monard, D., Rentsch, M., Schuerch-Rathgeb., Y. und Lindsay, R.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. im Druck
- 290. Offner, H., Konat, G. und Clausen, J., Neurobiol. 5, 192-196 (1975)
- 291. Armelin, H.A., Nishikawa, K. und Sato, G.H., in: Clarkson, B. und Baserga, R. (Herausgeber), Control of proliferation in animal cells, Cold Spring Harbour Laboratory N.Y., 97-104 (1974)
- 292. Reiser, G., unveröffentlicht
- 293. Cham, B.E. und Knowles, B.R., J. Lipid. Res. 17, 176-181 (1976)
- 294. Koschel, K., Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 358, 265 (1977)
- 295. Bashor, M.M. und Saier, jr., M.H., Fed. Proc. 35, 1715 (1976)
- 296. Atlas, D., Steer, M.L. und Levitzki, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 1921-1925 (1976)

297. Reiter, M.J., Cowburn, D.A., Prives, J.M. und Karlin, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 69, 1168-1172 (1972)
298. Karlin, A. und Cowburn, D.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70, 3636-3640 (1973)
299. Moran, J.F. und Triggle, D.J., in: Danielli, J.F., Moran, J.F. und Triggle, D.J., Fundamental Concepts in Drug Receptor Interactions, 133-176, Academic Press., N.Y., London (1970)
300. Wofsy, L., in: Sercarz, E.E., Williamson, A.R. und Fox, F., The Immun System, 259-269, Academic Press, N.Y., London (1974)
301. McIntosh, C.H.C. und Hesck, R.D., Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 376-383 (1975)
302. Williams, C.A. und Chase, M.W. (Herausgeber), Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol.1, 161, Academic Press., N.Y., London (1967)
303. Yaffe, D. in: Kruse, P.F. und Patterson, jr. M.K., Tissue Culture, 106-114, Academic Press., N.Y. London (1973)
304. Miyamoto, E., Kuo, J.F. und Greengard, P., J. Biol. Chem. 244, 6395-6402 (1969)
305. Morgat, J.L., Hung, L.T., Cardinaud, R., Fromageot, P., Bockaert, J., Imbert, M. und Morel, F., Journal of Labelled Compounds IV, 276-284 (1970)
306. Stulberg, C.S. und Simpson, W.F. in: Kruse, P.F. und Patterson jr. M.K., Tissue Culture, 744-749, Academic Press., N.Y., London (1973)
307. Mendelson, W., Blackburn, D. und Spaziano, V., Proceedings of the 2nd International Conference on Methods Preparing and Storing Labelled Compounds, 815-822, Brüssel (1966)
308. Spieß, J., Dissertation, Universität München (1976)
309. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

Lebenslauf

geboren am 30. August 1948 in Münster/Westf.

Eltern: Dr. Jan van Calker, Univ. Dozent,
Anneliese van Calker, geb. Arndt

1955-1966 Volksschule und Gymnasium in Münster/Westf.

1966-1967 Gymnasium in Düsseldorf

1967 Reifeprüfung am Städt. Humboldt Gymnasium,
Düsseldorf

1967-1973 Studium der Chemie in Freiburg i.Br.

1972 Diplom - Hauptprüfung

1972-1973 Diplomarbeit am Institut für Biologie III
der Universität Freiburg, unter Leitung
von Dozent Dr. K. Hilse ("Eigenschaften der
isoakzeptierenden Valin-Transfer-Ribonuklein-
säuren aus Kaninchenretikulocyten")

1974-1977 Ausführung vorliegender Doktorarbeit unter
Anleitung von Dr. B. Hamprecht, Max-Planck-
Institut für Biochemie, Martinsried (Leitung
Prof. Dr. F. Lynen).

